

Über die Bestimmung von SH-Gruppen an nativer und bestrahlter Lactatdehydrogenase

von

Erika Müller

aus

Ludwigsburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548407_0012

Aus dem Institut für Physikalische und Medizinische Strahlenkunde
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

Über die Bestimmung von SH-Gruppen an nativer und bestrahlter Lactatdehydrogenase

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Erika Müller

aus

Ludwigsburg



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly
Referent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 2. 1973

Meinem Mann gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Experimenteller Teil	5
2.1. Materialien	5
2.1.1. Chemikalien	5
2.1.2. Geräte	6
2.2. Methoden	7
2.2.1. Allgemeines	7
2.2.2. Entsalzen des Proteins	8
2.2.3. Messung der Proteinkonzentration	8
2.2.4. Bestimmung der enzymatischen Aktivität	8
2.2.5. Bestrahlung	10
2.2.6. Gelchromatographische Auftrennung	11
2.2.7. Diafiltration	12
2.2.8. SH-Bestimmung	13
2.2.8.1. Bestimmung der freien SH-Gruppen	13
2.2.8.2. Bestimmung des gesamten SH-Gehalts	14
2.2.9. Analytische Ultrazentrifuge	15
3. Ergebnisse	16
3.1. DTNB- und TNB-Spektren	16
3.2. Eichkurven	19
3.3. Rückoxidation von TNB	23
3.4. Bedingungen für DTNB bei der SH-Bestimmung	25
3.5. Abhängigkeit der SH-Bestimmung von der DTNB-Konzentration	26
3.6. Abhängigkeit der SH-Bestimmung von der LDH-Konzentration	28
3.7. Bestrahlung der LDH und Auftrennung der Bestrahlungsprodukte	30
3.8. Diafiltration	38
3.9. Frei titrierbare SH-Gruppen von bestrahlter LDH bei verschiedenen Restaktivitäten	41
3.10. Frei titrierbare SH-Gruppen von bestrahlter LDH nach chromatographischer Auftrennung	45
3.11. Gesamter SH-Gehalt bei nativer und bestrahlter LDH	51
3.12. Untersuchungen mit der analytischen Ultrazentrifuge	54
4. Diskussion	58
5. Zusammenfassung	71
6. Literatur	73

1. Einleitung

Die Bestrahlung hat in der Medizin große Bedeutung erlangt. Sowohl in der Therapie als auch in der Diagnostik werden ionisierende Strahlen häufig verwandt. Daher ist man an einer Erweiterung der Kenntnisse über die Strahlenwirkung sehr interessiert. Es werden Untersuchungen besonders mit solchen Systemen durchgeführt, die zur Klärung der molekularen Wirkungsmechanismen des biologischen Strahlenschadens beitragen können.

Da bereits ein Bakterium aus chemischer Sicht ein recht komplexes Gebilde ist, wählt man für die Untersuchung strahlenbedingter molekularer Veränderungen biologisch wichtige Makromoleküle, wie Nucleinsäuren und Proteine. Besonders geeignete Proteine sind Enzyme, deren biologische und physikalisch-chemische Eigenschaften bekannt sind und deren Aktivität leicht meßbar ist. Auf diese Weise ist es möglich, strahlenbedingte Veränderungen am Proteinmolekül im Verhältnis zum Inaktivierungsgrad zu untersuchen. Es wurde deshalb für unsere Untersuchungen über die Wirkung von ionisierenden Strahlen das Enzym Lactatdehydrogenase ausgewählt, dessen Struktur und biochemisches Verhalten schon weitgehend erforscht sind.

LDH gehört zu den 'SH-Enzymen', d.h. zu denjenigen Enzymen, die SH-Gruppen besitzen. Diese SH-Enzyme sind Gegenstand vieler strahlenbiologischer Untersuchungen. Ein Grund dafür mag sein, daß mehrere Methoden zur Verfügung stehen, die SH-Gruppen nachzuweisen. Ein weiterer Grund für das Interesse an SH-Enzymen ist, daß SH-Enzyme bekannt sind, bei denen durch eine Maskierung von SH-Gruppen die enzymatische Aktivität verloren geht. Die SH-Gruppen, die

eine so große Bedeutung für die enzymatische Aktivität des Enzyms besitzen, werden als 'essentielle SH-Gruppen' bezeichnet. Es wird angenommen, daß sie an den 'aktiven Zentren' des Moleküls beteiligt sind. LDH V, die in dieser Arbeit untersucht werden soll, besitzt wahrscheinlich auch essentielle SH-Gruppen. Schließlich ist ein weiterer wichtiger Grund, daß SH-Gruppen besonders strahlenempfindlich sind.

In mehreren Arbeiten über bestrahlte SH-Enzyme wird die strahlenbedingte Inaktivierung der Enzyme in Abhängigkeit von der Schädigung der essentiellen SH-Gruppen gesehen. Diese Meinung wird zum Beispiel von ADELSTEIN (19,20) und SANNER und PIHL (25) vertreten. SANNER und PIHL verweisen auf die Tatsache, daß in allen bisher untersuchten SH-Enzymen neben der Strahleninaktivierung eine Zerstörung von SH-Gruppen nachgewiesen werden konnte. Die unterschiedliche Strahlenempfindlichkeit der SH-Enzyme beruhe größtenteils darauf, daß die Strahlenempfindlichkeit der SH-Gruppen in den einzelnen Enzymen nicht gleich sei.

Die Zerstörung von Cystein (einer Aminosäure mit einer freien SH-Gruppe) ist jedoch nicht die einzige Veränderung der Primärstruktur der bestrahlten Proteine. Es wurde nachgewiesen, daß auch andere Aminosäuren durch die Bestrahlung abgebaut werden. Es erfolgen zudem durch die Bestrahlung nicht nur Veränderungen der Primärstruktur sondern auch der Tertiärstruktur. Es ergibt sich deshalb die Frage, ob den SH-Gruppen innerhalb derart komplexer Vorgänge eine besondere Bedeutung beizumessen ist.

Die veränderte Tertiärstruktur der bestrahlten Moleküle wurde durch Auftrennung bestrahlter Enzyme mit der Gel-filtration gefunden. Es wurden dabei verschieden große Bestrahlungsprodukte isoliert. Es war jedoch nicht klar, ob

die Vergrößerung der bestrahlten Moleküle allein durch eine Entfaltung, allein durch eine Aggregation oder durch beide Mechanismen gleichzeitig zustande kommt.

In einer Arbeit von DENKL (14) wurden bei LDH V ebenfalls mit Hilfe der Gelfiltration verschieden große Bestrahlungsprodukte nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, auf welche Weise diese Bestrahlungsprodukte entstehen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen soll die Frage stehen, ob die bestrahlten Moleküle entfaltet sind, und wenn sie entfaltet sind, wie stark diese Entfaltung ist. Die Aggregation kann im Rahmen dieser Arbeit nur am Rande behandelt werden.

Die Entfaltung der Moleküle soll auf Grund der Reaktivität der 'freien' SH-Gruppen bestimmt werden. Es wird davon ausgegangen, daß sich beim nativen Enzym einige freie, reaktionsfähige SH-Gruppen an der Oberfläche des Moleküls befinden, während die übrigen SH-Gruppen im Innern des Moleküls verdeckt und einem angreifenden Reagenz nicht zugänglich sind. Durch eine Entfaltung des Moleküls werden mehr SH-Gruppen freigesetzt und es können mehr 'freie' SH-Gruppen reagieren. Diese Methode läßt sich auch bei Enzymen anwenden, bei denen im nativen Zustand keine SH-Gruppen reagieren. Eine Entfaltung läßt sich in gleicher Weise erkennen, wenn beim geschädigten Molekül reaktionsfähige SH-Gruppen vorhanden sind.

Die Bestimmung der SH-Gruppen ist bei diesen Untersuchungen also ein Hilfsmittel, um molekulare Strukturveränderungen erfassen zu können. Es wurde gerade die SH-Gruppe gewählt, da sie sich im Vergleich zu anderen Gruppen leicht nachweisen läßt.

Die Bestimmung der freien SH-Gruppen soll nicht nur beim bestrahlten Enzym sondern auch bei den durch Gelfiltration erhaltenen Bestrahlungsprodukten durchgeführt werden, um zu sehen, welche Rolle die Entfaltung in den einzelnen isolierten Komponenten einnimmt und welcher Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Aktivität der einzelnen Komponenten und ihrer Entfaltung besteht.

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge soll festgestellt werden, ob eine Aggregation von bestrahlten Molekülen stattfindet oder nicht.

Um beurteilen zu können, in wie weit der Abbau von Cystein im Vergleich mit der Strukturänderung zur Inaktivierung beiträgt, sollen auch die gesamten SH-Gruppen sowohl von nativer als auch von bestrahlter LDH nach Auffaltung des Moleküls in 7 M Harnstoff bestimmt werden.

Es sollte mit Hilfe der beschriebenen Untersuchungen möglich sein, wesentliche strahlenbedingte Veränderungen zu erfassen, die zur Inaktivierung des Enzyms LDH V führen.

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

Lactatdehydrogenase^{*} aus Kaninchenskelettmuskel, eine Kristallsuspension in 2,2 M Ammoniumsulfat, β -Nikotinamid-adenin-dinucleotid^{*} in reduzierter Form als di-Natriumsalz (80 %ig) und Pyruvat als mono-Natriumsalz von der Fa. Boehringer und Soehne GmbH, Mannheim; 5,5-Dithiobis-(2-nitro-benzoesäure)^{*}, Äthylendiamintetraessigsäure^{*} als di-Natriumsalz und L-Gluthathion reduziert (>98 %ig) von der Fa. Serva, Heidelberg; Sephadex G-25 fine und G-200 von der Fa. Pharmacia, Uppsala; alle übrigen Chemikalien wurden analysenrein von der Fa. Merck AG, Darmstadt, bezogen. Es wurde nur entionisiertes und doppelt quarzdestilliertes Wasser verwendet.

^{*} Abkürzungen

Lactatdehydrogenase = LDH
 β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid = NAD
reduzierte Form des NAD = NADH
Äthylendiamintetraessigsäure = EDTA
Dithiobisnitrobenzoesäure = DTNB
Thiobisnitrobenzoesäure = TNB
Parachloromercuribenzoat = PCMB

2.1.2. Geräte

Folgende Geräte wurden benutzt:

1. Therapie-Röntgenröhre TR 300 f der Fa. Siemens, Bereich Medizinische Technik, Erlangen
2. Kälte-Thermostat Ultra Kryomat TK 30 der Fa. Wobser, Lauda
3. Spektralphotometer PMQ II der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, mit Quarz-Suprasilküvetten der Fa. Hellma, Müllheim; Schichtdicke 1 cm
4. Photometer "Eppendorf" mit temperierbarem Küvettenhalter und Monochromatfilter 334 nm,
5. Photometer "Eppendorf" mit Nephelometerzubehör und Monochromatfilter 578 nm,
6. Micropipetten Marburg (50 μ l - 1000 μ l) und Micromixer 3350 der Fa. Eppendorf Gerätebau Netheler und Hinz, Hamburg
7. P_H -Meter 27 der Fa. Radiometer, Kopenhagen
8. Gasmonitor und pO_2 -Elektrode der Fa. Radiometer, Kopenhagen
9. Ultrafiltrationszelle Modell 52 mit Diaflo-Membran PM 30 der Fa. Amicon Corp., Lexington U.S.A.
10. Fraktionssammler LKB Ultro Rac der Fa. LKB Producter, Stockholm
11. Kühlgerät Colora der Fa. Colora Meßtechnik, Lorch
12. Elektrisches Magnetührgerät JKA-Combimag der Fa. Janke und Kunkel, Staufen
13. Plexiglas-Chromatographieröhre, in der Werkstatt des Instituts gefertigt
 - a) zum Entsalzen des Proteins: 57,5 cm lang (Gelbett 51,5 cm), 1,4 cm Durchm.
 - b) zum Auftrennen: 209,0 cm lang (Gelbett 200 cm) 2,0 cm Durchm.

- 14⁺ Analytische Ultrazentrifuge Spinco, Modell E der
Fa. Beckman, Instruments GmbH, München
- 15⁺ Microdensitometer der Fa. Kipp + Zonen, Schönberg/Taunus
- 16⁺ Meßmikroskop für Schlierenplatten, Fa. Leitz, Wetzlar

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeines

Um die verwendeten Enzymlösungen steril zu halten, wurde bei dieser Arbeit stets unter folgenden Bedingungen gearbeitet:

Alle Glasgeräte (Chromatographiesäulen, Pipetten, Bechergläser usw.) wurden mit 70%igem Alkohol gewaschen. Sämtliche Puffer und Gele wurden vor Gebrauch 20 Minuten bei 120° C autoklaviert und dann bei 4° C aufbewahrt. Die Säulen waren mit einem Kühlmantel umgeben, so daß die Gel-filtration ebenfalls bei 4° C durchgeführt werden konnte. Vor Gebrauch wurden die Säulen mit einem Liter sterilem Puffer gespült, der 1 mMol EDTA/l zur Entfernung der Schwermetallionen enthielt. Beim Auftragen der Proteinlösung leiteten wir N₂ durch die Säulen, um zu verhindern, daß Keime aus der Luft in das Gel eindringen.

Zur Kontrolle der Keimfreiheit wurden Proben auf Agar-Platten aufgetragen und 24-48 Stunden bei 37° C inkubiert.

+

Im Institut für Physiologische Chemie

2.2.2. Entsalzen des Proteins

Die verwendete LDH wurde als Suspension in 2,2 M Ammoniumsulfat von der Fa. Boehringer bezogen. Wir überführten die LDH auf einer Chromatographiesäule (57,5 cm lang, 1,4 cm Durchmesser) mit dem Dextrangel Sephadex G-25 fine in den gewünschten Puffer. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde die Suspension im Elutionspuffer gelöst (50/50). Der Puffer bestand aus einer Mischung von K_2HPO_4 und NaH_2PO_4 (Verhältnis 2:1), p_H 7,1. Der Puffer war 0,067 M und besaß eine Ionenstärke von 0,15. Das Eluat wurde im Fraktionssammler in Fraktionen zu je 45 Tropfen, das entspricht 3 ml, aufgefangen. Die Proteinkonzentration wurde ausgemessen (siehe 2.2.3.) und die hoch konzentrierten Fraktionen vereinigt. Mit Neßlers Reagens prüften wir, ob das eluierte Protein frei von Ammoniumsulfat war.

2.2.3. Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch bei 280 nm in 1 cm-Küvetten bestimmt. Den Extinktionswert von 1,44 ml/mg cm entnahmen wir einer Arbeit von JÄNICKE und KNOF (1). Er basiert auf dem Trockengewicht von Kaninchenskelettmuskel LDH bei 106° C(1).

2.2.4. Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die spezifische Aktivität (IU/mg) der LDH wurde nach dem optischen Test von WARBURG mit dem Photometer bestimmt. Dieser Test beruht auf der von LDH katalysierten Reaktion:



deren Gleichgewicht auf der rechten Seite liegt.

Die zeitliche Abnahme an NADH läßt sich bei 334 nm messen, da NADH hier im Gegensatz zu NAD eine starke Absorption aufweist.

Für unsere Messungen benutzten wir folgenden Testansatz:

3,00 ml 1/15 M PO_4 -Puffer p_H 7,4

0,05 ml NADH-Lösung

0,10 ml Enzymverdünnung

0,05 ml Pyruvat-Lösung

NADH war in einer Konzentration von 7,1 mg/ml in 1 %igem NaHCO_3 und Pyruvat in einer Konzentration von 8,6 mg/ml in H_2O gelöst. Beide Lösungen sollten nicht älter als zwei Tage sein. Die Messungen wurden bei 25° C durchgeführt. Die Enzymverdünnung wurde so gewählt, daß die Extinktionsänderung über ungefähr zwei Minuten konstant blieb. Die Extinktion wurde in Abständen von je 15 sec gemessen. Von den gemessenen Extinktionen E_1 , E_2 , E_3 usw. zu den Zeitpunkten t_1 , t_2 , t_3 usw. wurden die Extinktionsänderungen pro 15 sec berechnet. Die mittlere Extinktionsänderung, bezogen auf eine Minute, diente nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz zur Berechnung des verbrauchten NADH (Mol/Min cm = IU/ml). Die spezifische Aktivität (IU/mg) läßt sich durch Einsetzen der Proteinkonzentration berechnen.

Unsere Messungen ergaben eine mittlere spezifische Aktivität von 582 IU/mg mit einem relativen Fehler von 5,8 %.

2.2.5. Bestrahlung

Wir bestrahlten jeweils 10 ml Proteinlösung, die unter einem Stickstoffstrom langsam gerührt wurde. Die Proteinkonzentration variierte je nach Versuch. Bestrahlt wurde mit einem Röntgengerät bei 200 kV Röhrenspannung und 20 mA Röhrenstrom. Es wurde kein Filter benutzt; die Eigenfilterung der Röhre entsprach 2 mm Aluminium. Der Abstand der Probenoberfläche zum Fokus betrug 124 mm.

Die Messung der Dosisleistung wurde mit Hilfe eines Plexiglasphantoms durchgeführt, das in der Mitte eine Meßkammer^{*} enthielt. Das Phantom wurde an Stelle der Probe in die Tubushalterung gespannt. Genaue Angaben zur Dosismessung finden sich in der Arbeit von Herrn KUNIGK(32). Die berechnete Dosisleistung beträgt 2400 R/Min, das entspricht 2 220 rad/Min.

Die Bestrahlungsdauer betrug maximal 3 Stunden; alle 20 Minuten wurden Proben für die Aktivitätsbestimmung entnommen. Für die Berechnung der Dosisleistung wurde vernachlässigt, daß durch die Entnahme der Proben die Schichtdicke von 10 mm um 0,5 mm abnahm.

Der Bestrahlungstopf bestand aus Quarz und wurde von einem Kühlmantel aus Plexiglas umgeben. Der Kühlmantel war an einen Kryostaten angeschlossen. Während der Bestrahlung wurde die Temperatur der Enzymlösung auf 4° C gehalten. Den Verschuß des Quarztopfes bildete eine 0,03 mm starke Hostaphanfolie. In dem Quarztopf war ein mit Teflon überzogener Magnetrührer, der die Proteinlösung während der Bestrahlung rührte. Dadurch wurde eine gleichmäßigere Dosisverteilung und eine schnellere Verdrängung des Sauerstoffs erreicht.

^{*} Die Dosismessung führten dankenswerterweise Herr Dr. Th. Schmidt und Herr K. Kunigk(32) durch.

45 Minuten vor der Bestrahlung und die ganze Zeit während der Bestrahlung leiteten wir nachgereinigten und gekühlten Stickstoff über die Proteinlösung, um den Sauerstoff zu verdrängen.

Messungen des Sauerstoffpartialdruckes pO_2 ergaben einen schnellen Abfall des pO_2 , wenn über die Lösung Stickstoff geleitet wurde und zusätzlich noch gerührt wurde. Die Messungen wurden mit dem Gasmonitor von Radiometer und einer pO_2 -Elektrode bei $5^\circ C$ durchgeführt. Nach 10, 30, 40, 60 und 120 Minuten wurde der pO_2 gemessen. Nach 40 Minuten stellte sich ein Endwert von $pO_2 = 15 \text{ mmHg}$ ein. Zur Berechnung des molaren Gehaltes an Sauerstoff wurde der technische Löslichkeitskoeffizient aus dem Taschenbuch für Chemiker und Physiker (DANS/LAX) verwendet. Ein pO_2 von 15 mmHg entspricht nach diesen Angaben $3,8 \times 10^{-5}$ Mol O_2 /l H_2O . Zum Beispiel bei einer 3 mg/ml konzentrierten LDH-Lösung würde 1,8 Mol O_2 auf ein Mol LDH kommen.

2.2.6. Auftrennung

Um die verschiedenen Bestrahlungsprodukte nach dem Molekularvolumen zu isolieren, trennten wir einen Teil der bestrahlten Proteinlösung durch Gelfiltration auf. Wir benutzten eine Flexiglassäule (200 cm lang und 2 cm Durchmesser) mit dem Dextrangel Sephadex G 200, das ein besonders hohes Ausschlußvolumen ($MG \geq 800\,000$) besitzt. Um möglichst keimfrei zu arbeiten, leiteten wir Stickstoff mit Hilfe einer Mariottischen Flasche durch die Säule. Die Säule wurde von unten nach oben eluiert. Bei einer Durchflußrichtung von oben nach unten könnte der Wasserdruck (12-15 cm H_2O) zu einer Kompression des Gelbetts führen.

Nähere Angaben über die Säuleneigenschaften siehe Arbeit von Herrn KUNIGK (32).

Als Elutionsmittel benutzten wir den gleichen Puffer wie beim Entsalzen mit einem Zusatz von 1 mMol EDTA/l (als Schwermetallfänger wegen der SH-Bestimmungen, die mit dem eluierten Protein durchgeführt werden sollten, siehe 2.2.8.). Das Eluat wurde im Fraktionssammler in Fraktionen zu je 3 ml aufgefangen. Nach dem Ausmessen des Proteingehaltes konnten im Elutionsdiagramm verschiedene peaks bestimmt werden. Die hoch konzentrierten Fraktionen der einzelnen peaks wurden zusammengeschüttet. Eine Auftrennung dauerte 60-70 Stunden.

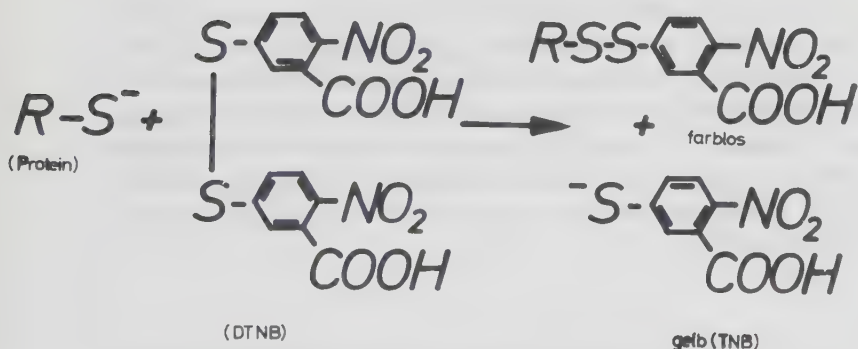
2.2.7. Diafiltration

Die Proteinkonzentrationen waren nach der chromatographischen Auftrennung des bestrahlten Proteins zum Teil für die folgenden SH-Bestimmungen zu gering. Wir erhöhten die Konzentration mit Hilfe der Diafiltration. In der Diafiltrationszelle engten wir das Volumen der Proteinlösung von 50-60 ml auf knapp 10 ml ein. Unter Stickstoffdruck (1,7 - 2,0 Atm.) wurde der Puffer durch eine Membran (PM 30) gepreßt, und die Proteinmoleküle reicherten sich in der Zelle an. Der Rührer der Zelle wurde mit einem elektrischen Magnetrührgerät betrieben (ungefähr 50 Umdrehungen/Minute). Das Magnetrührgerät wurde durch eine Asbestplatte von der Zelle wärmeisoliert. Die Diafiltration wurde in einem Kühlgerät bei 4°C durchgeführt. Zu Beginn der Diafiltration wurde der Druck in der Zelle langsam gesteigert und am Ende langsam abgelassen, so daß die LDH-Lösung in der Zelle nicht schäumte.

2.2.8. SH-Bestimmung

2.2.8.1. Bestimmung der freien SH-Gruppen

Unsere SH-Bestimmungen führten wir mit ELLMANS Reagens (4,5), Dithiobisnitrobenzoesäure, abgekürzt DTNB, aus. DTNB besteht aus zwei über eine Disulfidgruppe verbundenen Phenolkörpern. In Anwesenheit einer SH-Gruppe wird durch Disulfidaustausch die Thiobisnitrobenzoesäure, abgekürzt TNB, freigesetzt, die im ionisierten Zustand eine Gelbfärbung verursacht.



Das Absorptionsmaximum des TNB liegt bei 412 nm (4). Zur Berechnung der Konzentration diene der molare Extinktionskoeffizient von

$$13\,600 \frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}} \quad (4).$$

Das DTNB lösten wir in 0,1 M PO_4 -Puffer bei pH 7, die Lösung war 19,5 M. Je nach gewünschter DTNB-Konzentration wurden 0,05-0,4 ml dieser Lösung zur SH-Bestimmung verwendet. Der Testansatz zur Messung der SH-Gruppen bestand aus 3 ml. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten variierten je nach Versuch:

DTNB-Lösung

LDH-Lösung + 1mMol EDTA/l

1/15 M PO_4 -Puffer, pH 7,1 + 1mMol EDTA/l

Für den Testansatz benutzten wir Puffer mit dem Zusatz von 1 mMol EDTA/l zum Abfangen der Schwermetallionen. Wir inkubierten die LDH eine Nacht mit EDTA, wenn sie vorher nicht mit EDTA chromatographiert wurde (z.B. nach Entsalzen).

Nach der Bestimmung einiger SH-Gruppen denaturierte die LDH. Es konnte nicht bestimmt werden, welcher Teil der Extinktion durch Absorption und welcher durch Streuung hervorgerufen wurde. Parallel zur SH-Bestimmung wurde deshalb die Trübung mit einem Photometer und einem dazu passenden Trübungsmeßzusatz bei 576 nm gemessen. Die Messungen wurden beendet, wenn die Transmission 3 % vom Anfangswert erreicht hatte.

2.2.8.2. Bestimmung des gesamten SH-Gehaltes mit Harnstoff

Um alle SH-Gruppen der LDH bestimmen zu können, muß das Protein entfaltet werden. Wir benutzten zur Entfaltung 7 M Harnstoff. Der Harnstoff wurde vor den Versuchen einmal mit Äthanol umkristallisiert und anschließend im Exsiccator getrocknet. Die Harnstofflösung wurde vor jedem Versuch neu hergestellt.

Als Ausgangslösung für folgenden Testansatz diente eine 8,65 M Harnstofflösung:

0,4 ml LDH-Lösung

0,1 ml DTNB-Lösung

2,5 ml 1/15 M PO_4 + 1 mMol EDTA/l + 8,65 Mol Harnstoff/l

Im Leerwert wurde an Stelle von LDH-Lösung Pufferlösung verwandt.

2.2.9. Analytische Ultrazentrifuge

Als Ergänzung unserer Untersuchungen der bestrahlten LDH wurden für uns einige Läufe in der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt.* Es handelte sich um Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe, bei denen sowohl Schlieren als auch UV-Optik benutzt wurde.

* Die Versuche wurden dankenswerterweise von Herrn Dipl.-Phys. Fey, Institut für Physiologische Chemie, Erlangen, ausgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. DTNB- und TNB-Spektrum

Die Kenntnis des DTNB- und TNB-Spektrums sind Voraussetzung für SH-Bestimmungen nach der Ellmanschen Methode. Es wurden deshalb beide Spektren von uns aufgenommen.

Die Extinktion von DTNB wurde gegen einen Leerwert mit 0,01 M PO_4 -Puffer gemessen. Die Konzentration des DTNB in der Meßküvette betrug ungefähr 1×10^{-4} Mol/l, das DTNB war gelöst in 0,01 M PO_4 -Puffer, pH 7. Das DTNB-Spektrum hat im untersuchten Wellenlängenbereich ein Maximum bei 330 nm.

Die Extinktion von TNB wurde mit Hilfe einer Glutathionlösung gemessen. Glutathion ist ein Tripeptid (H -Glu-Cys-Gly-OH) mit der Aminosäure Cystein. Wird eine Glutathionlösung mit DTNB versetzt, so findet bei neutralem und basischem pH ein Disulfidaustausch statt. Es entstehen TNB und das modifizierte Glutathion (vgl. 2.2.8.).

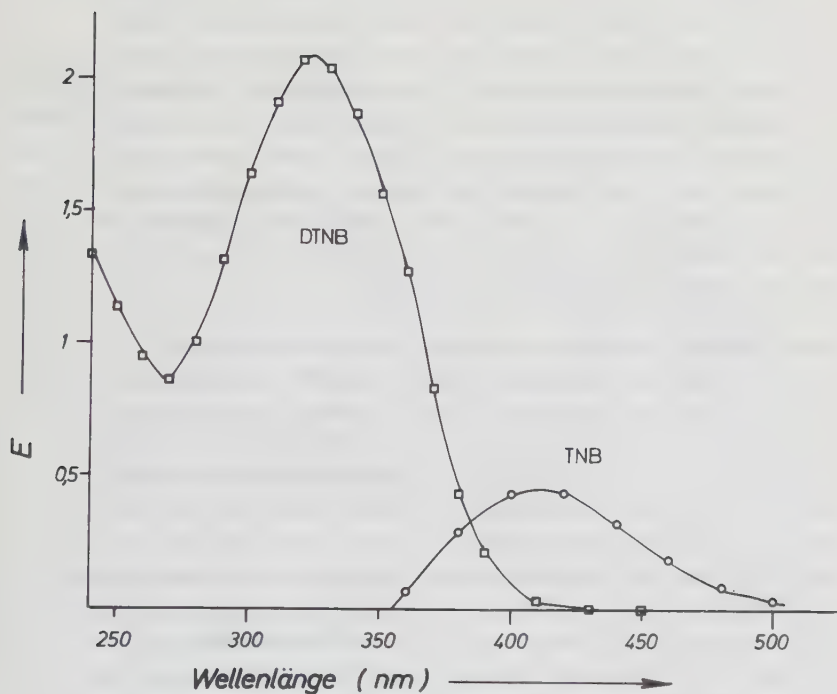


Abb. 2: Absorptionsspektrum von DTNB und TNB. Extinktion von 1×10^{-4} M DTNB-□-□- in 0,01 M PO_4 -Puffer, pH 7, gegen Leerwert ohne DTNB gemessen. Extinktion von TNB -o-o- nach Reaktion von 0,033 mM Glutathion mit 1×10^{-4} M DTNB in 0,01 M PO_4 -Puffer und 1 mMol EDTA/l, pH 7, gegen Leerwert ohne Glutathion gemessen.

Die Messung wurde mit einer 0,033 mM Glutathionlösung bei einem Zusatz von ungefähr 1×10^{-4} Mol DTNB/l und 1 mMol EDTA/l in 0,01 M PO_4 -Puffer bei pH 7 durchgeführt. Als Leerwert diente eine Lösung ohne Glutathion bei gleicher DTNB- und EDTA-Konzentration (Glutathion zeigt bei Wellenlängen oberhalb 260 nm keine Extinktion). In der Meßküvette ist allerdings nach der Reaktion mit Glutathion die DTNB-Konzentration um 33 % erniedrigt und daher erhält man unterhalb von 360 nm negative Extinktionswerte. Das TNB-Spektrum hat ein Maximum bei 412 nm; dies stimmt mit den Angaben von ELLMAN (4) überein.

Unsere SH-Bestimmungen wurden bei 412 nm durchgeführt. Aus dem DTNB-Spektrum ergibt sich, daß DTNB bei 412 nm noch eine geringe Extinktion hat. Bei einer DTNB-Konzentration von $1,3 \times 10^{-4}$ Mol/l liegt die Extinktion im Bereich von 0,02. Wird wie bei den folgenden SH-Bestimmungen mit erhöhten DTNB-Konzentrationen gearbeitet, so ist auch die Extinktion entsprechend erhöht. Um eine Überlagerung der Extinktion von TNB mit der Extinktion von DTNB zu verhindern, ist bei allen SH-Bestimmungen ein Leerwert mit gleicher DTNB-Konzentration wie in der Meßküvette notwendig. Da bei unseren SH-Bestimmungen die TNB-Konzentration im Vergleich zur DTNB-Konzentration noch viel niedriger ist als im vorliegenden Spektrum (ungefähr 1 %), läßt sich die oben berücksichtigte DTNB-Konzentrationsdifferenz zwischen Meßküvette und Leerwert nach dem Disulfidaustausch vernachlässigen.

3.2. Eichkurven

Zur Bestimmung der Genauigkeit der spektrophotometrischen SH-Bestimmungen mit DTNB wurden Eichkurven mit einer Eichsubstanz, d.h. einer Substanz mit bekanntem SH-Gehalt, gemacht. Als Eichsubstanz diente Glutathion.

Die freie SH-Gruppe des Glutathions reagiert mit DTNB nach dem oben beschriebenen Disulfidaustausch (siehe 2.2.8.):

Von einer 1 mM Glutathionlösung in 0,01 M PO_4 -Puffer, pH 7 wurde eine Verdünnungsreihe von 0,1 - 1 mM hergestellt. Zur Messung der SH-Gruppen der verschiedenen Glutathionverdünnungen diente folgender Testansatz:

0,2 ml 19,5 mM DTNB

0,1 ml Glutathion-Verdünnung

2,7 ml 0,01 M PO_4 -Puffer + 1 mMol EDTA/l

Es wurde gegen einen Leerwert ohne Glutathion gemessen:

0,2 ml 19,5 mM DTNB

2,8 ml 0,01 M PO_4 -Puffer + 1 mMol EDTA/l

Durch Auftragen der Glutathionkonzentration auf der Abszisse und der gemessenen Extinktion, bzw. der Anzahl der SH-Gruppen, auf der Ordinate, erhält man die Eichkurven, wie sie in Abb. 3 und 4 dargestellt sind.

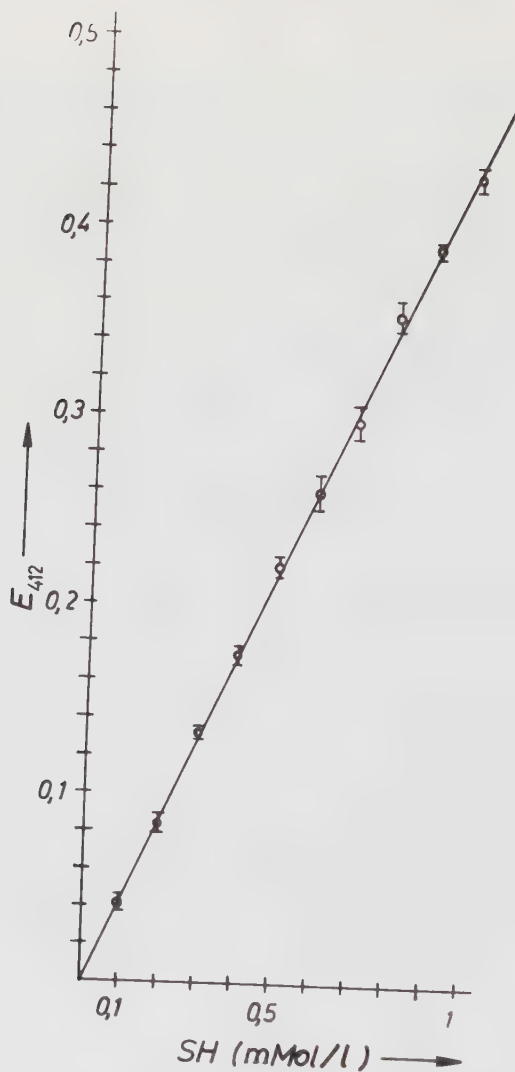


Abb. 3: Eichkurve von TNB. Extinktion E_{412} von TNB nach Reaktion von Glutathion (0,1 - 1 mMol/l) mit 1,33 mM DTNB in 0,01 M PO_4 -Puffer und 1 mMol EDTA/l, pH 7, bei Zimmertemp., gegen Leerwert ohne Glutathion gemessen. Ausbeute von 98 % der SH-Gruppen.

Das gekaufte Glutathion soll zu 98 % in reduzierter Form vorliegen. Diese 98 % entsprechen dem tatsächlichen SH-Gehalt der Eichlösung und können somit als 100 % des gesamten SH-Gehalts angegeben werden.

Die Mittelwerte aus den Meßwerten wurden nach $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$ und die Standardabweichung nach
$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

berechnet. Aus diesen Mittelwerten wurde mittels linearer Regression die Gerade $y = mx + b$ errechnet.

Der Einfluß folgender Bedingungen auf die Eichkurven wurde untersucht:

a) Ionenstärke

Es wurden Eichkurven bei verschiedener Ionenstärke ohne Temperaturkontrolle (Zimmertemperatur ungefähr 20° C) nach Entgasen der Lösungen aufgenommen. Es wurde einmal in 0,01 M PO_4 -Puffer, pH 7 gemessen und im Vergleich dazu in 0,01 M PO_4 -Puffer, pH 7, dem 1 Mol NaCl/l zugesetzt war. Es wurde keine Beeinflussung der Reaktion mit DTNB festgestellt. Bei beiden Meßreihen konnten durchschnittlich 98,3 % des gesamten SH-Gehalts bestimmt werden. Die mittlere Standardabweichung der Einzelmessungen betrug $E = 0.0059$.

b) Temperatur und Entgasen

Für die Eichkurven bei konstanten Temperaturen wurden temperierbare Küvettenhalter und ein Thermoelement zur Temperaturkontrolle benutzt.

Versuche bei 15° C ergaben die gleichen Ausbeute an SH-Gruppen wie die Versuche, die bei Zimmertemperatur durchgeführt wurden (~98 %). Eichkurven, die bei 25 - 28° C aufgenommen wurden, zeigten eine erniedrigte TNB-Ausbeute (siehe Abb. 4). Es konnten durchschnittlich 89,7 % des gesamten SH-Gehalts bestimmt werden. Die mittlere Standardabweichung der Einzelmessungen betrug $E = 0.0063$.

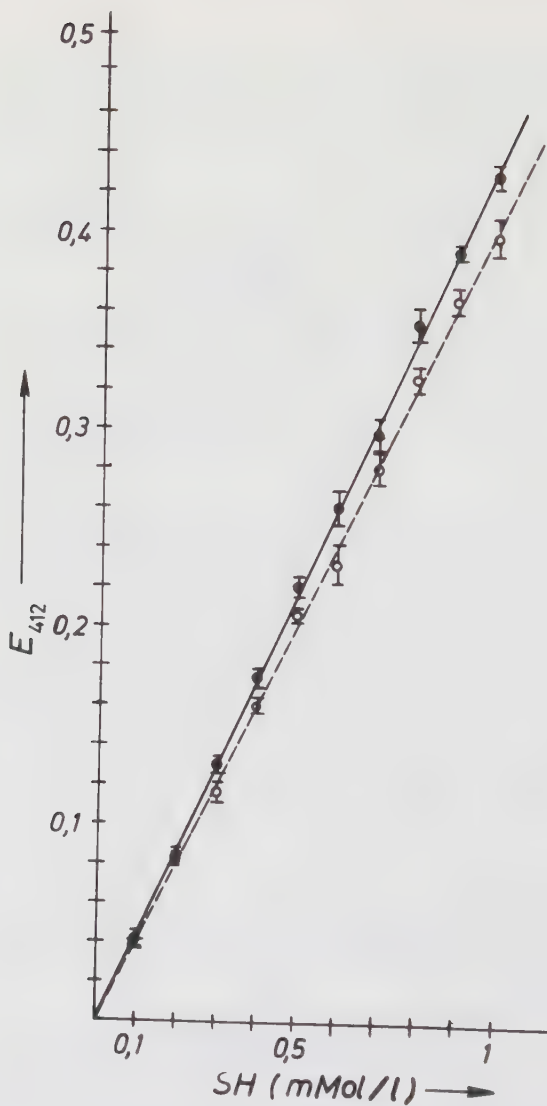


Abb. 4: Eichkurve von TNB bei 25 - 28° C (gestrichelte Linie). Ausbeute von 89 % der SH-Gruppen. Eichkurve bei Zimmertemp. (durchgezogene Linie).

Es ist möglich, daß dieser Effekt auf eine erhöhte O_2 -Sättigung bei den erwärmten Lösungen zurückzuführen ist, durch die eine verstärkte Rückoxidation der TNB-Moleküle zu DTNB erfolgt. Die Lösungen in den Küvetten sind bis zur Einstellung der Temperatur der Luft ausgesetzt, so daß der O_2 -Partialdruck wieder ansteigt, obwohl die Lösungen vorher entgast wurden. Die Eichkurven waren nämlich gleichermaßen erniedrigt, wenn die verwandten Lösungen nicht kurz vor der Messung mit der Wasserstrahlpumpe entgast wurden.

Die SH-Bestimmungen dieser Arbeit wurden ohne Entgasen und ohne Temperaturkontrolle durchgeführt. Es gab dafür folgende Gründe:

a) Viele Messungen wurden in dem Bereich $E < 0,1$ gemacht, wo zwischen den beiden aufgenommenen Eichkurven kein signifikanter Unterschied besteht (siehe Abb.).

b) Das Entgasen von LDH-Lösungen ist schwierig, da die Lösungen stark schäumen. LDH denaturiert dabei sehr leicht und fällt aus.

3.3. Rückoxidation von TNB

Die Extinktion von TNB in einer Lösung ist nicht konstant. Sie nimmt wegen der Rückoxidation des TNB zu DTNB langsam ab. Die Abnahme an TNB wurde mit folgendem Testansatz gemessen:

0,1 ml 1 mM Glutathionlösung

0,2 ml 19,5 mM DTNB-Lösung

2,7 ml 0,01 M PO_4 -Puffer + 1 mMol EDTA/l, pH 7

Als Leerwert diente der entsprechende Ansatz ohne Glutathion.

Während der Messung wurde der Leerwert jede Stunde durchschnittlich um 0.005 auf Null zurückgestellt, so wie auch bei allen anderen SH-Bestimmungen verfahren wurde.

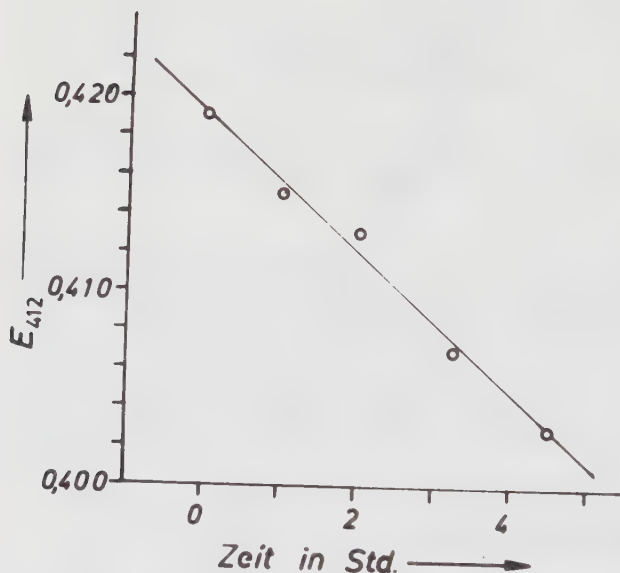


Abb. 5: Rückoxidation von TNB. Extinktionsabnahme einer Lösung mit 0,033 mM Glutathion, 1,33 mM DTNB, 0,01 M PO_4 -Puffer und 1 mMol EDTA/l, pH 7.

Die Extinktion bei 412 nm wurde über knapp 5 Stunden gemessen. In einer Stunde nahm die Extinktion im Mittel nur um 0.0032 ab.

3.4. Bedingungen für DTNB bei der SH-Bestimmung

Die DTNB-Stammlösung sollte hoch konzentriert sein, so daß für die SH-Bestimmung ein kleines Volumen dieser Stammlösung ausreicht. Um eine optimale Löslichkeit zu erhalten, wurden folgende Versuche durchgeführt:

a) Der pH des Puffers wurde variiert.

Je alkalischer der pH war, desto besser löste sich DTNB. Es ließ sich z.B. eine 10 mM DTNB-Lösung in 0,1 M PO_4 -Puffer bei pH 4 nicht herstellen. Bei pH 7 dagegen löste sich das DTNB unter vergleichbaren Bedingungen, ebenso bei pH 9. Bei pH 9 war die Lösung intensiver gelb gefärbt als bei pH 7.

b) Eine starke Abhängigkeit zeigte die Löslichkeit von der Molarität des Puffers. Während in 0,01 M PO_4 -Puffer das Herstellen z.B. einer 10 mM DTNB-Lösung bei pH 7 nicht möglich ist, gelingt es leicht in 0,1 M PO_4 -Puffer.

Da das DTNB hauptsächlich für SH-Bestimmungen bei LDH gebraucht wurde, lösten wir das DTNB im Bereich des pH-Optimums von LDH (pH 7 - 7,4) bei pH 7. Es wurde eine 19,5 mM DTNB-Stammlösung in 0,1 M PO_4 -Puffer verwandt. Je nach Versuchsbedingungen wurden 0,05 - 0,4 ml dieser Stammlösung in die Meßküvette mit insgesamt 3 ml einpipettiert. Das entspricht einer Molarität des DTNB in der Meßküvette zwischen 0,33 und 2,66 mMol/l.

3.5. Abhängigkeit der SH-Bestimmung von der DTNB-Konzentration

Die Reaktion von DTNB mit den freien SH-Gruppen eines Proteins ist bei konstanter LDH-Konzentration stark von der Konzentration des DTNB abhängig. Je größer die DTNB-Konzentration ist, desto schneller reagieren vorhandene SH-Gruppen, desto schneller denaturiert jedoch das Protein und fällt aus (siehe Abb. 6). Die Ausfällung des Proteins bestimmten wir durch ständige parallel zur Messung verlaufende Trübungsmessungen. Bei einer Trübung von 3 % bei 578 nm beendeten wir die Messung. Das Einsetzen der Trübung ist bei niederen Konzentrationen schwierig zu bestimmen, da die spektrophotometrisch meßbare Reaktion nur langsam ansteigt.

Unsere SH-Bestimmungen führten wir in der Regel bei einer relativ niedrigen DTNB-Konzentration aus. Bei hohen DTNB-Konzentrationen ist der Fehler der Messung erhöht. Dieser Fehler ist dadurch bedingt, daß die Extinktion eines Leerwerts (DTNB + Puffer) bei einer DTNB-Konzentration von z.B. 2,66 mMol/l 0.42 beträgt.

Wird in einem solchen Fall bei niedriger LDH-Konzentration gearbeitet, d.h. wenig SH-Gruppen können mit DTNB reagieren und die TNB-Ausbeute ist gering, so liegt die Extinktion des Meßwerts z.B. zwischen 0.02 und 0.04. Wäre der Fehler des Leerwerts 1 %, so wäre bei der SH-Bestimmung mit einem Fehler von 10 - 20 % zu rechnen.

Um diesen Fehler möglichst klein zu halten, die Messungen aber auch nicht zu lang auszudehnen, wählten wir für unsere Versuche normalerweise eine DTNB-Konzentration von 0,66 mMol/l (das entspricht einer Extinktion des Leerwerts von 0.116 ± 0.0054 d.h. der Fehler des Leerwerts betrug bei unseren Messungen 4,7 %).

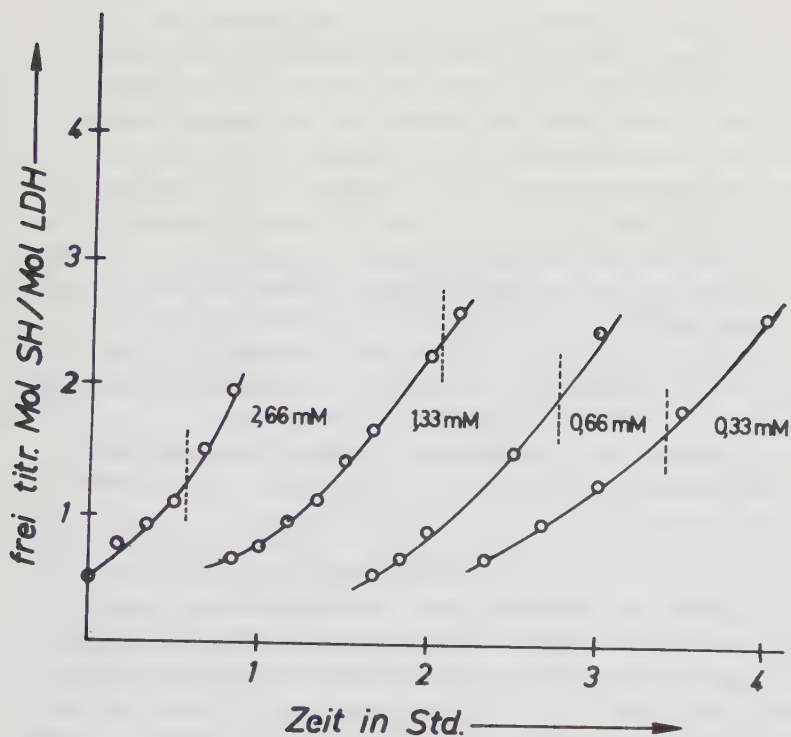


Abb. 6: Frei titrierbare SH-Gruppen von nativer LDH V in Abhängigkeit von der DTNB-Konzentration (0,33 mM; 0,66 mM; 1,33 mM; 2,66 mM), bei konst. LDH-Konzentration ($1,9 \times 10^{-6}$ M). 0,067 M PO_4 -Puffer und 1 mMol EDTA/l, pH 7, 1). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die meßbare Trübung.

3.6. Abhängigkeit der SH-Bestimmung von der LDH-Konzentration

Die Reaktion des DTNB mit den freien SH-Gruppen eines Proteins ist bei konstanter DTNB-Konzentration stark von der Proteinkonzentration abhängig. Je größer die LDH-Konzentration ist, desto schneller lassen sich SH-Gruppen spektrophotometrisch nachweisen, desto schneller kommt es aber auch zur Denaturierung und zur meßbaren Ausfällung des Proteins (siehe Abb. 7). Bei niederen LDH-Konzentrationen lassen sich freie SH-Gruppen erst zu einem späteren Zeitpunkt gut nachweisen als bei höheren Konzentrationen. Die Extinktion von TNB beträgt z.B. bei einer 7×10^{-7} M Lösung nach der Reaktion von 1 SH-Gruppe pro Molekül weniger als 0.015, während die Extinktion einer 1×10^{-5} M Lösung nach der Reaktion von 1 SH-Gruppe mehr als 0.1 beträgt.

Bei niedriger LDH-Konzentration ist eine Bestimmung des Trübungsbeginns schwierig, da die Trübung langsam und kaum meßbar zunimmt.

Bei unseren Versuchen zur SH-Bestimmung wurde wegen der Meßgenauigkeit eine möglichst hohe LDH-Konzentration angestrebt (im Bereich von $1-4 \times 10^{-6}$ M). Bei diesen LDH-Konzentrationen ist die Extinktion von TNB schon bei wenigen SH-Gruppen so hoch, daß eine Messung durchzuführen ist. Außerdem ist der oben diskutierte Fehler durch den Leerwert (siehe 3.5.) umso kleiner je größer der Meßwert ist.

Um mit vergleichbaren LDH-Konzentrationen bei der SH-Bestimmung zu arbeiten, modifizierten wir die Testansätze, wenn es möglich war. Abhängig von der gegebenen LDH-Konzentration, z.B. der bestrahlten und gelchromatographisch getrennten LDH, variierten wir das Verhältnis Puffer zu LDH-Lösung in der Meßküvette.

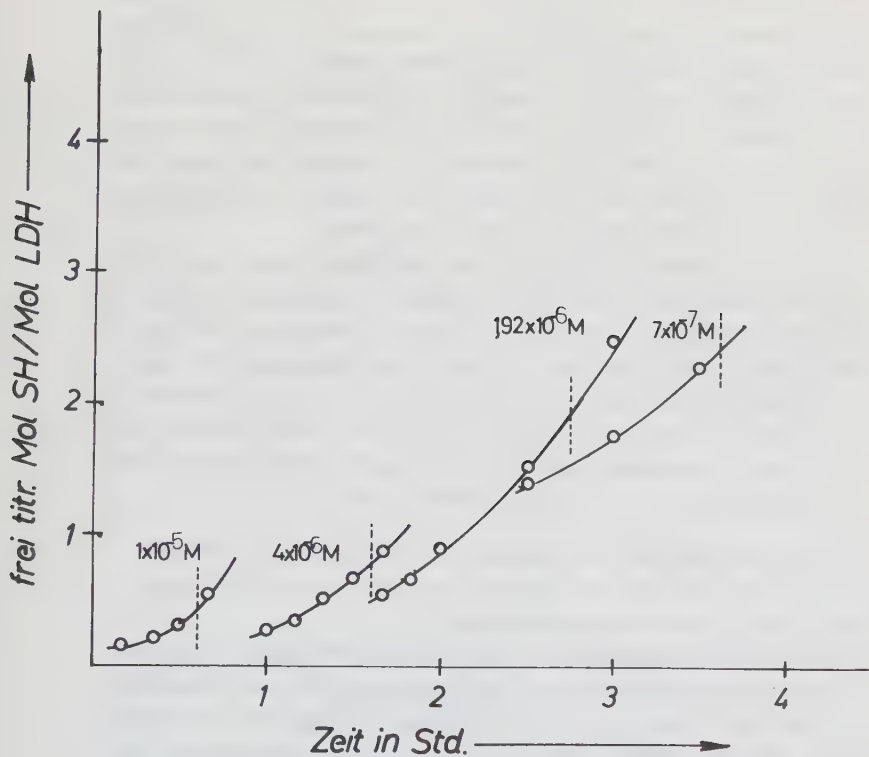


Abb. 7: Frei titrierbare SH-Gruppen von nativer LDH V in Abhängigkeit von der LDH-Konzentration (7×10^{-7} M; $1,9 \times 10^{-6}$ M; 1×10^{-5} M) bei konst. DTNB-Konzentration (0,66 mM). 0,067 M PO_4 -Puffer und 1 mMol EDTA/l, pH 7,1. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die meßbare Trübung.

3.7. Bestrahlung der LDH und Auftrennung der Bestrahlungs- produkte

LDH wurde in Lösung mit einer Röntgenröhre bestrahlt, wie unter 2.2.5. im Einzelnen ausgeführt wurde.

Die Inaktivierung des Enzyms mit zunehmender Dosis ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Dosis-Effektkurve zeigt einen exponentiellen Verlauf, und die D_{37} beträgt 244 krad; die D_{37} von Lösungen, die mit Zusatz von EDTA im Bestrahlungspuffer bestrahlt wurde, beträgt 388 krad.

Für SH-Bestimmungen der bestrahlten LDH-Lösung, die nicht chromatographisch aufgetrennt wurde, entnahmen wir aus dem Bestrahlungsgefäß nach 60, 110 und 180 Minuten, das entspricht einer Dosis von 133 krad, 244 krad und 400 krad, je 1 ml LDH-Lösung. Die Schichtdicke der Lösung im Bestrahlungsgefäß wurde durch die Entnahme der Proben nur so geringfügig verändert, daß diese Volumenabnahme bei der Dosisberechnung vernachlässigt werden konnte.

Um SH-Bestimmungen an getrennten Bestrahlungsprodukten durchführen zu können, wurde die bestrahlte LDH-Lösung durch Gelfiltration aufgetrennt.

Die Gelchromatographie beruht auf dem Prinzip, daß die Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen in einem einheitlichen Dextrangel von der Molekülgröße abhängt. Große Moleküle wandern schnell durch die Säule, sie werden also in den ersten Fraktionen eluiert, während kleine Moleküle in das Gel eindringen und deshalb langsam durch die Säule wandern und später eluiert werden als große. Ist eine bestimmte, von den Säuleneigenschaften abhängige Molekülgröße überschritten, so können verschieden große Moleküle nicht mehr getrennt werden. Diese Moleküle wandern alle gleich schnell im sog. Ausschlußvolumen, das noch vor den ersten aufgetrennten Molekülen eluiert wird.

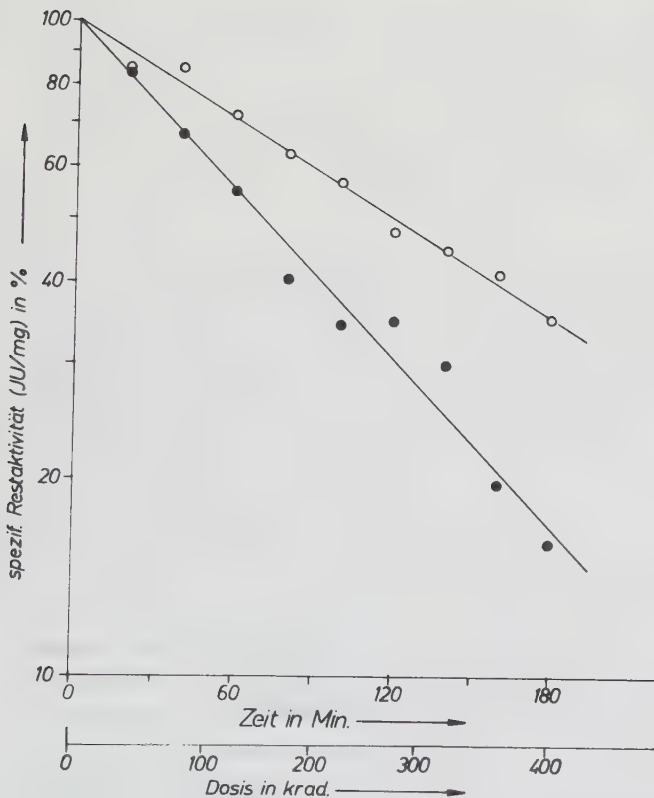


Abb. 8[⌘]: Abhängigkeit der Enzymaktivität (in % des Anfangswertes) von der Strahlendosis (in krad) einer 3,5 mg/ml LDH V-Lösung -●-●-, 0,067 M PO₄-Puffer, pH 7,1. Dosis-Effektkurve einer gleich konz.⁴ LDH-Lösung bei Zusatz von 1 mMol EDTA/l im Bestrahlungspuffer -o-o-.

[⌘] Die Abb. 8,9 und 10 wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Kunigk hergestellt.

Die Trennung nach der Molekülgröße dient bei globulären Proteinen zur Bestimmung des Molekulargewichtes. Die Säulen werden mit Hilfe von globulären Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht geeicht. Bei Molekülen, die keine globuläre Struktur haben und unterschiedlich weit entfaltet sind, lassen sich nur die Molekülvolumen oder die scheinbaren Molekulargewichte vergleichen.

Die von uns verwendete G-200 Säule (209 cm lang und 2 cm Durchmesser) hatte ein Ausschlußvolumen von 258 ml, so daß globuläre Moleküle mit einem Molekulargewicht von gleich und größer als 800 000 in den Fraktionen 75 bis 100 eluiert wurden. Molekulargewichte, die nach der Eichung bestimmten Fraktionen entsprechen, sind in Abb. 9 angegeben (nähere Angaben zur Säuleneichung siehe Arbeit von Herrn KUNIGK, 32).

Bei einer Konzentration der bestrahlten LDH-Lösung von 3,4 mg/ml und einer applizierten Dosis von 400 krad erhielt man bei der Trennung über Sephadex G-200 das in Abb. 9 wiedergegebene Elutionsdiagramm.

Der peak I unserer Abbildung enthält Moleküle mit einem Molekulargewicht von ungefähr 140 000, d.h. im Bereich des Molekulargewichts von nativer LDH. Die Moleküle des peak II haben ein scheinbares Molekulargewicht von >200 000, d.h. mit einem zwei- bis dreifachen Molekülvolumen von nativer LDH. Der peak III, der größte peak, enthält stark vergrößerte Bestrahlungsprodukte mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 800 000 und darüber, d.h. Moleküle mit dem sechs- oder mehrfachen Molekülvolumen von nativer LDH.

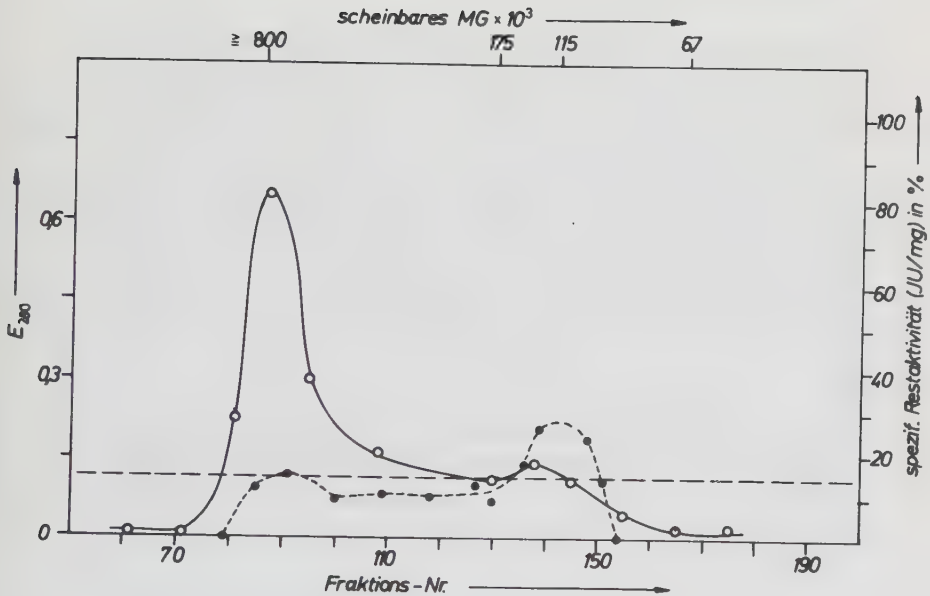


Abb. 9: Auftrennung einer mit 400 krad bestrahlten LDH V-Lösung (3,4 mg/ml) über Sephadex G-200 ($E_{280} \hat{=}$ Proteinkonzentration) -o-o-.

Elutionsmittel: 0,067 M PO_4 -Puffer, pH 7,1.
 Spezif. Aktivität der getrennten Bestrahlungsprodukte ---●---. Spezif. Aktivität der nicht getrennten Probe ---.

Die Restaktivität des bestrahlten, noch nicht getrennten Proteins betrug unter den angegebenen Bedingungen ungefähr 14 - 17 % der nativen Enzymaktivität. Die Verteilung der Restaktivitäten in den einzelnen peaks ist in Abb. 9 ebenfalls dargestellt.

Die Konzentrationen der peaks waren im Vergleich zur Konzentration der bestrahlten LDH-Lösung sehr gering. Nach der Auftrennung einer LDH-Lösung, die z.B. während der Bestrahlung eine Konzentration von 3,4 mg/ml hatte, war die mittlere Konzentration des peak I (ungefähr 13 Fraktionen mit je 3 ml) ungefähr 0,05 mg/ml und die des peak III (ungefähr 15 Fraktionen mit je 3 ml) 0,4 mg/ml. Die Konzentration des peak II ist unter diesen Bedingungen so gering, daß wir sie nicht bestimmten. Man würde hier auch besser von einer Gruppe II als von einem peak sprechen.

Wird die LDH-Lösung dagegen mit einem Zusatz von 1 mMol EDTA/l bei gleicher Konzentration mit gleicher Dosis bestrahlt wie die LDH-Lösung ohne EDTA, so ergibt sich eine veränderte Dosis-Effektkurve (siehe Abb. 8) und nach der Gelfiltration ein verändertes Chromatogramm, wie in Abb. 10 zu sehen ist.

Bei dieser Auftrennung fehlen die stark vergrößerten Bestrahlungsprodukte des peak III. Der peak I, der Moleküle mit ungefähr dem Molekulargewicht von nativer LDH enthält, ist groß im Verhältnis zu peak II, der Moleküle mit dem scheinbaren Molekulargewicht von ~250 000 enthält. Der peak I ist hier auch bedeutend größer als der peak I des Chromatogramms von Abbildung 9.

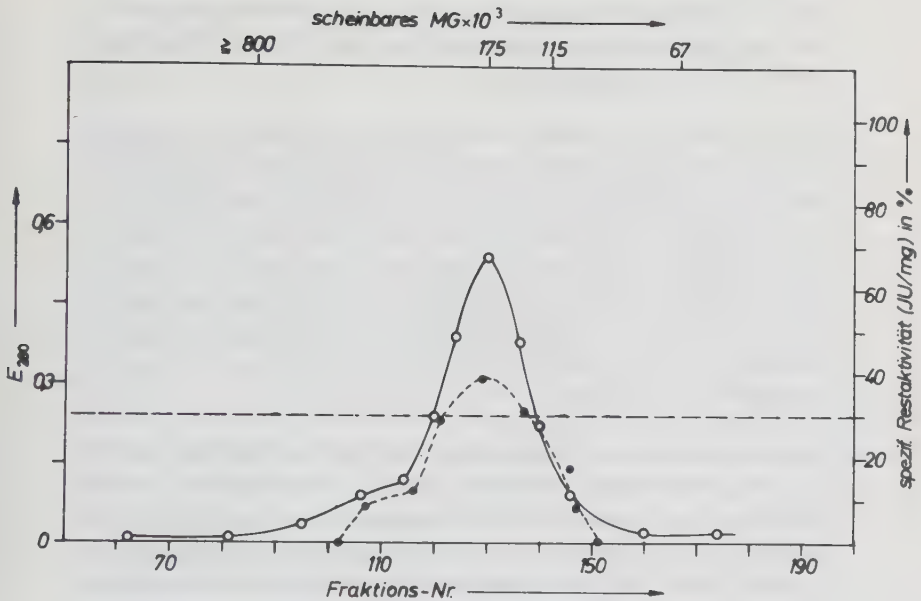


Abb. 10: Auftrennung einer mit 400 krad bestrahlten LDH V-Lösung (3,4 mg/ml) über Sephadex G-200. Zusatz von 1 mmol EDTA/l im Bestrahlungspuffer -o-o-. Elutionsmittel: 0,067 M PO_4 -Puffer, pH 7,1. Spezif. Aktivität der getrennten LDH ---●--- und der nicht getrennten ---.

Die Restaktivität beträgt unter diesen Bedingungen ungefähr 35 % der Aktivität des nativen Enzyms. Die Verteilung der Aktivität über die einzelnen peaks ist in Abb. 10 dargestellt.

Nach der Auftrennung einer bestrahlten LDH-Lösung von z.B. 3,5 mg/ml betrug die mittlere Konzentration des peak I (16 Fraktionen mit je 3 ml) ungefähr 0,3 mg/ml und die mittlere Konzentration des peak II (19 Fraktionen mit je 3 ml) 0,06 mg/ml.

Zu den Konzentrationsbestimmungen muß ergänzend ausgeführt werden, daß nicht aufgetrennter, bestrahlter LDH die Konzentration der nativen LDH-Lösung zugrunde gelegt wird. Bei bestrahlten und chromatographisch getrennten Proben müssen jedoch neue Konzentrationsbestimmungen durchgeführt werden. Da wir die Konzentration durch die Messung der Extinktion bei 280 nm unter Benutzung des Extinktionskoeffizienten von 1,44 bestimmten (siehe 2.2.3.), muß folgendes berücksichtigt werden:

- a) Die Extinktion von bestrahlter LDH ist bei 280 nm im Vergleich zu nativer LDH erhöht, wie in der Arbeit von Herrn DENKL gezeigt wurde. Die Ursache dafür ist das Streulicht der vergrößerten Teilchen, die bei der Bestrahlung entstanden sind. Es ist anzunehmen, daß besonders in peak III, der die stark vergrößerten Teilchen enthält, das Streulicht eine größere Extinktion bedingt als dem tatsächlichen Proteingehalt der Lösung entspricht. Unseren SH-Berechnungen des peak III wäre somit eine zu hohe Proteinkonzentration zugrunde gelegt worden und der erhaltene SH-Gehalt ist zu niedrig.
Bei peak I kann es kein Streulicht geben, da er keine vergrößerten Moleküle besitzt.
- b) Der Extinktionskoeffizient von nativer LDH gilt nicht genauso für bestrahlte LDH. Die Abnahme z.B. von Tyrosin (siehe Arbeit von Herrn DENKL) muß zu einer Änderung des Extinktionskoeffizienten führen, da Tyrosin bei 280 nm absorbiert. Dieser Effekt muß jedoch gering sein, da nur we-

nig absorbierende Aminosäuren bei der Bestrahlung abnehmen. Wird der Extinktionskoeffizient durch eine Abnahme an absorbierenden Aminosäuren verringert, so muß die tatsächliche Proteinkonzentration höher und der SH-Gehalt niedriger liegen als von uns berechnet wurde.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die wichtigste Korrektur der Konzentrationsbestimmungen darin besteht, daß die Konzentration in den peak III der folgenden Versuche zu hoch angegeben ist. Nach den Angaben von Herrn DENKL erhöht sich die Extinktion einer LDH-Lösung nach Bestrahlung um 6-10 %. Da in unserer LDH-Lösung (PO_4 -Puffer ohne Zusatz von 1 M NaCl) nach der Bestrahlung meist eine Trübung vorhanden war (Tyndall Effekt), kann man damit rechnen, daß die sehr vergrößerten Teilchen des peak III eine noch höhere Extinktion hervorrufen als in der Arbeit von Herrn Denkl. Nach Ergebnissen unserer Gesamt-SH Bestimmungen (siehe 3.11.) läßt sich abschätzen, daß die Extinktion und damit die Konzentrationsangabe um 10 - 14 % erhöht sein muß.

Bei der chromatographischen Trennung der bestrahlten LDH sollte noch ein weiterer Punkt beachtet werden. Die 72-stündige Trennung in der Säule erfolgt zwar unter N_2 , doch beim Auffangen des Eluats im Fraktionssammler kommt es zur O_2 -Sättigung der Lösung. Es ist möglich, daß außen gelegene SH-Gruppen dabei leichter oxidieren als wenn die SH-Bestimmungen sofort bei der unter N_2 bestrahlten LDH-Lösung durchgeführt werden. Nach den Ergebnissen der Gesamt-SH Bestimmungen nehmen wir an, daß nur eine geringfügige Oxidation stattfindet (2 - 3 %).

3.8. Diafiltration

Die Konzentrationen der Bestrahlungsprodukte, die wir nach gelchromatographischer Trennung in den verschiedenen peaks erhielten, waren sehr gering, wie oben ausgeführt wurde. Um SH-Bestimmungen durchführen zu können, erhöhten wir die LDH-Konzentration mit Hilfe der Diafiltration. Es war eine Konzentrationserhöhung um das 3-5-fache der ursprünglichen Konzentration möglich.

Es soll hier kurz auf unsere Erfahrungen mit der Diafiltration eingegangen werden. Es gelang nicht, LDH-Lösung mit der Membran XM 100 zu diafiltrieren. Diese Membran soll Moleküle mit einem Molekulargewicht, das größer ist als 110 000, zurückhalten. Die Membran war jedoch für native Moleküle durchgängig (dies zeigte sich, als LDH-Suspension mit Hilfe der Diafiltration entsalzt werden sollte). Dies bestätigt die Beobachtung von Herrn DENKL(14), daß LDH sich auch bei der Gelchromatographie nicht wie ein Molekül mit dem Molekulargewicht von ungefähr 140 000 sondern wie eines mit dem Molekulargewicht von ungefähr 110 000 verhalte.

Weitere Versuche wurden mit den Membranen PM 10 und PM 30 (mit und ohne inerten Membranträger) gemacht. Da die Durchlaufzeit des Puffers bei der Membran PM 30 kürzer war, verwendeten wir nur noch diese Membran.

Gelöste LDH wird leicht durch Schäumen denaturiert und ausgefällt. Die LDH muß deshalb während der Diafiltration vorsichtig behandelt werden. Die Drucksteigerung und die Drucksenkung in der Diafiltrationszelle sollten äußerst langsam durchgeführt werden. Die Umdrehungszahl

des Magnetrührers in der Zelle sollte niedrig gehalten werden. Trotz dieser Maßnahmen beobachteten wir bei längerer Diafiltration eine zunehmende Trübung in der Zelle. Eine Diafiltration, wie z.B. beim Entsalzen nativer LDH-Suspension (Dauer ungefähr 10 Stunden), war deshalb nicht möglich. Keine Trübung wurde festgestellt, wenn die LDH-Lösung nicht entsalzt sondern nur kurze Zeit konzentriert wurde (ungefähr 1 1/2 Stunden bei PM 30 Membranen ohne inerten Membranträger). Schon bei etwas verlängerten Diafiltrationszeiten (3 - 4 Stunden), wie wir sie zum Konzentrieren bei PM 30 Membranen mit inertem Membranträger benötigten, trat eine geringfügige Trübung (Tyndall Effekt) auf.

Es wurde von uns untersucht, ob die kurze Diafiltration zur Konzentrierung der peaks einen Einfluß auf die freien SH-Gruppen oder den gesamten SH-Gehalt der LDH besitzt. Es zeigte sich, daß eine Bestimmung der freien SH-Gruppen, die von einer Fraktion des peak III der bestrahlten und durch Gelfiltration aufgetrennten LDH-Lösung gemacht wurde, gut übereinstimmte mit einer SH-Bestimmung, die von den übrigen Fraktionen des gleichen peak nach vorausgegangener Konzentrierung mit Hilfe der Diafiltration gemacht wurde (siehe Abb. 11).

Übereinstimmende Werte ergab auch die Bestimmung des gesamten SH-Gehaltes in Harnstoff bei der nicht diafiltrierten und bei der diafiltrierten LDH-Lösung.

Die Diafiltration konnten wir auf Grund dieser Ergebnisse zur Konzentrierung verwenden, ohne befürchten zu müssen, daß durch dieses Verfahren das Verhalten der SH-Gruppen gegenüber dem Ellmanschen Reagenz verändert wird.

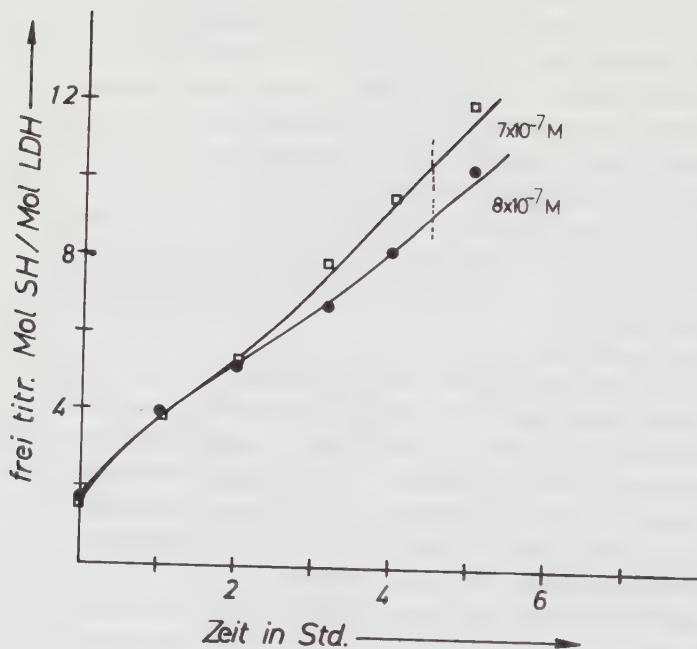


Abb. 11: Frei titrierbare SH-Gruppen von LDH eines peak III ($7 \times 10^{-7} \text{ M}$), die nicht diafiltriert wurde und von LDH des gleichen peak ($8 \times 10^{-7} \text{ M}$), die durch Diafiltration eingeengt wurde (von 0,32 mg/ml auf 0,72 mg/ml).
 0,067 M PO_4 -Puffer, 1 mMol EDTA/l, 0,66 mM DTNB, pH 7,1.

3.9. Frei titrierbare SH-Gruppen von bestrahlter LDH bei verschiedenen Restaktivitäten

Es wurden die frei titrierbaren SH-Gruppen von bestrahlten LDH-Lösungen, die nicht chromatographisch getrennt wurden, untersucht. Die Lösungen hatten gleiche DTNB- und gleiche LDH-Konzentration. Die Bestrahlungsdauer wurde variiert, so daß durch die unterschiedlich große Dosis verschiedene Restaktivitäten vorlagen.

Vor den SH-Bestimmungen wurden die bestrahlten Proben 12-24 Stunden lang mit 1 mMol EDTA/l inkubiert, um Schwermetallionen, die SH-Gruppen blockieren, aus der Lösung zu entfernen. Ausführliche Angaben zur Methode der SH-Bestimmung siehe 2.2.8. Die Anzahl der SH-Gruppen, die unter den angegebenen Bedingungen mit DTNB reagierten, sind in Abhängigkeit von der Reaktionszeit in Abb. 12 aufgetragen.

Zum Vergleich sind die frei titrierbaren SH-Gruppen von nativer LDH-Lösung angegeben. Bei gleicher LDH- und DTNB-Konzentration sind in der ersten halben Stunde bei nativer LDH spektrophotometrisch keine SH-Gruppen nachweisbar. Es erfolgt ein langsamer Extinktionsanstieg, und nach einer Stunde reagiert knapp 1/2 Mol SH/Mol LDH. Jedoch noch bevor 1 Mol SH/Mol LDH bestimmt werden können, muß die Messung wegen zunehmender Trübung abgebrochen werden.

Dieses Ergebnis stimmt mit Werten aus der Literatur (4) überein, nach der auch die essentiellen SH-Gruppen von LDH V größeren Molekülen wie z.B. DTNB nicht zugänglich sind. Die Anwesenheit des organischen Reagenzes führt zu einer langsamen Denaturierung des Enzyms, so daß die SH-Gruppen allmählich zugänglich werden (5).

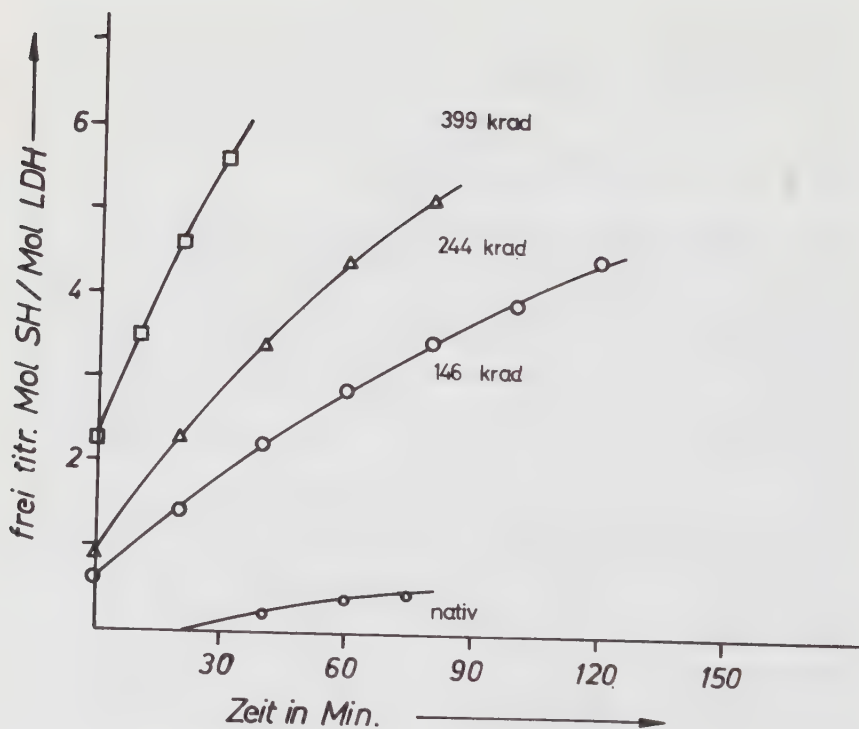


Abb. 12: Frei titrierbare SH-Gruppen von LDH V ($3,6 \times 10^{-6} M$), die mit verschieden großen Dosen (146 krad, 244 krad, 399 krad) bestrahlt wurde, in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zum Vergleich freie SH-Gruppen von nat. LDH gleicher Konz. 0,067 M PO_4 -Puffer, 1 mMol EDTA/l, pH 7,1, 0,66 mM DTNB.

Unsere Versuche zeigen, daß sich bestrahlte LDH bei der Ellmanschen Reaktion anders verhält als native. Bei dem mit einer Dosis von 146 krad bestrahlten Molekül (das entspricht einer Restaktivität des Enzyms von 45 %) ist sofort ungefähr $1/2$ Mol SH/Mol LDH reaktionsfähig, nach 60 Minuten reagieren 3 und nach 120 Minuten ungefähr $4 \frac{1}{2}$ Mol SH/Mol LDH. Der Anfangswert und der Anstieg der freien SH-Gruppen ist schon bei dieser Dosis größer als bei nativer LDH.

Bestrahlt man die LDH-Lösung mit einer Dosis von 244 krad (das entspricht einer Restaktivität von 27 %) oder gar mit einer Dosis von 400 krad (das entspricht einer Restaktivität von 12 %), so wird das veränderte Verhalten des Moleküls gegenüber DTNB deutlich sichtbar.

Die Messungen wurden abgebrochen, wenn in der Meßküvette eine Trübung bei der parallel zur SH-Bestimmung verlaufenden Trübungsmessung festgestellt wurde.

Wird die Bestrahlung mit EDTA im Bestrahlungspuffer durchgeführt, so findet sich bei einer Dosis von 400 krad (das entspricht einer Restaktivität von 35 %) ein Anstieg der freien SH-Gruppen wie er in Abb. 13 (gestrichelte Linie) dargestellt ist.

Bei gleicher eingestrahelter Dosis aber unterschiedlichen Restaktivitäten der untersuchten LDH-Lösungen reagieren unter vergleichbaren Konzentrationen genauso viel SH-Gruppen bei LDH-Lösungen, die mit Zusatz von einem organischen Reagenz, nämlich EDTA, bestrahlt wurden wie bei LDH-Lösungen, die ohne einen solchen Zusatz bestrahlt wurden (durchgezogene Linie, siehe auch Abb. 12).

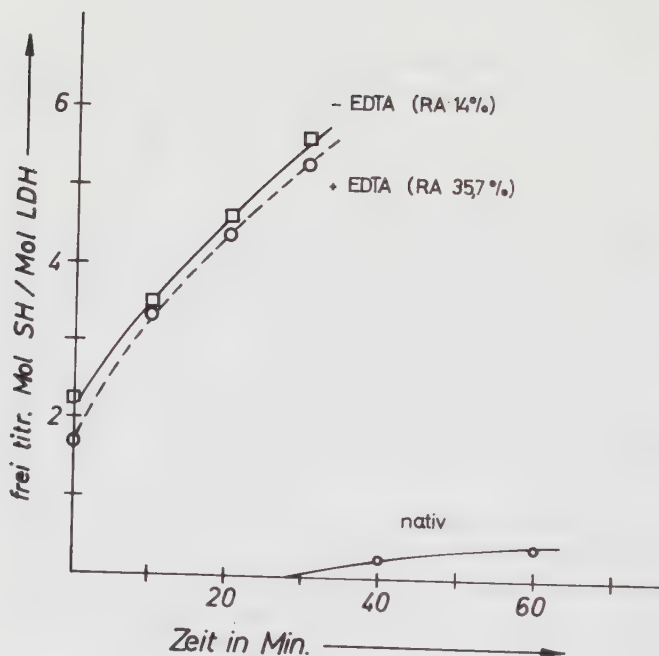


Abb. 13: Frei titrierbare SH-Gruppen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit von bestrahlter LDH V ($3,7 \times 10^{-6} \text{ M}$) mit EDTA im Bestrahlungspuffer, Restaktivität 35,7 % und von bestrahlter LDH ($3,6 \times 10^{-6} \text{ M}$) ohne EDTA im Bestrahlungspuffer, Restaktivität 14 %. Freie SH-Gruppen von nat. LDH gleicher Konz. 0,067 M PO_4 -Puffer, 1 mMol EDTA/l, pH 7,1, 0,66 mM DTNB, pH 7,1. Dosis der bestrahlten LDH: 400 krad.

3.10. Frei titrierbare SH-Gruppen von bestrahlter LDH nach chromatographischer Auftrennung

Die frei titrierbaren SH-Gruppen der Bestrahlungsprodukte wurden nach Trennung der bestrahlten LDH-Lösung durch Gelfiltration bestimmt. Bei LDH-Lösungen, die ohne Zusatz von EDTA bestrahlt wurden, konnten die SH-Bestimmungen nur bei peak I und III durchgeführt werden. Der peak II hatte eine so niedrige Konzentration (siehe 3.7.), daß weiterführende Messungen nicht möglich waren.

Die Bestimmung der SH-Gruppen des peak I (bei einer LDH-Konzentration von ungefähr 1×10^{-6} Mol/l und nach einer eingestrahlten Dosis von 400 krad) deutet auf eine Veränderung der Molekülstruktur dieser Bestrahlungsprodukte hin. In Abbildung 14 sind im Vergleich die freien SH-Gruppen von nativer LDH und peak I bei vergleichbaren Konzentrationen dargestellt.

Im Gegensatz zur nativen LDH ist bei peak I sofort ungefähr 1 Mol SH/Mol LDH reaktionsfähig. Der Anstieg der freien SH-Gruppen läßt sich wegen zunehmender Trübung nur 15 Minuten verfolgen. Die Bestrahlungsprodukte des peak I fallen bei der Ellmanschen Reaktion schnell aus. Nach 15 Minuten haben 2 1/2 SH-Gruppen mit DTNB reagiert.

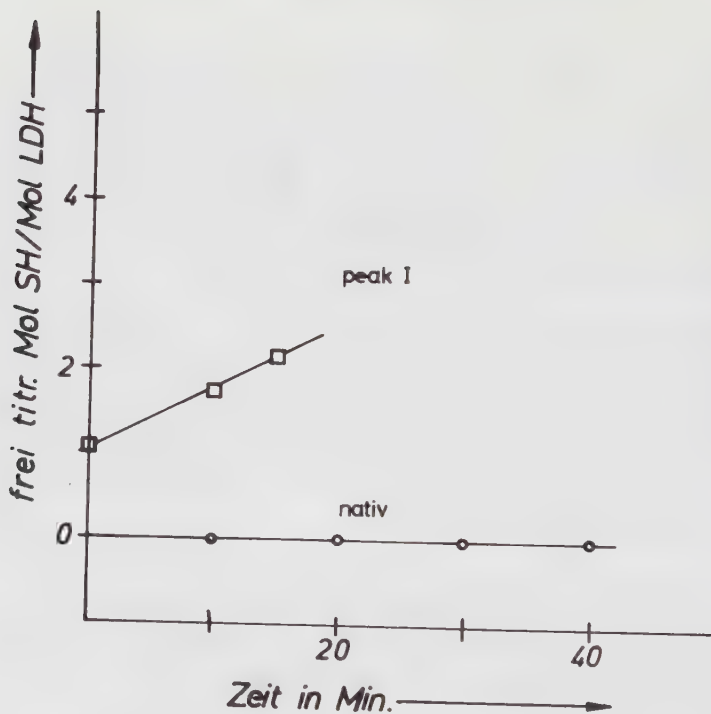


Abb. 14: Freie SH-Gruppen des peak I ($1,4 \times 10^{-6} \text{ M}$) einer mit 400 krad bestrahlten und chromatogr. getrennten LDH-Lösung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Freie SH-Gruppen von nat. LDH gleicher Konz.
0,067 M PO_4 -Puffer, 1 mMol EDTA/l, 0,66 mM DTNB, pH 7,1.

Der peak III, der das sechs- oder mehrfache Molekül-
volumen von nativer LDH, also sehr stark vergrößerte
Teilchen, besitzt, hat fast gleich viel sofort reaktions-
fähige SH-Gruppen wie peak I. Es reagieren 2 Mol SH/Mol
LDH. Jedoch während peak I schon nach kurzer Zeit aus-
fällt, läßt sich bei peak III eine Trübung frühestens nach
150 Minuten nachweisen. Bis zu diesem Zeitpunkt haben knapp
8 SH-Gruppen reagiert. Die freien SH-Gruppen des peak III
sind in Abbildung 15 wiedergegeben. Zum Vergleich sind auf
dieser Abbildung noch einmal die freien SH-Gruppen von
nativer LDH und vom peak I unter vergleichbaren Bedingun-
gen angegeben.

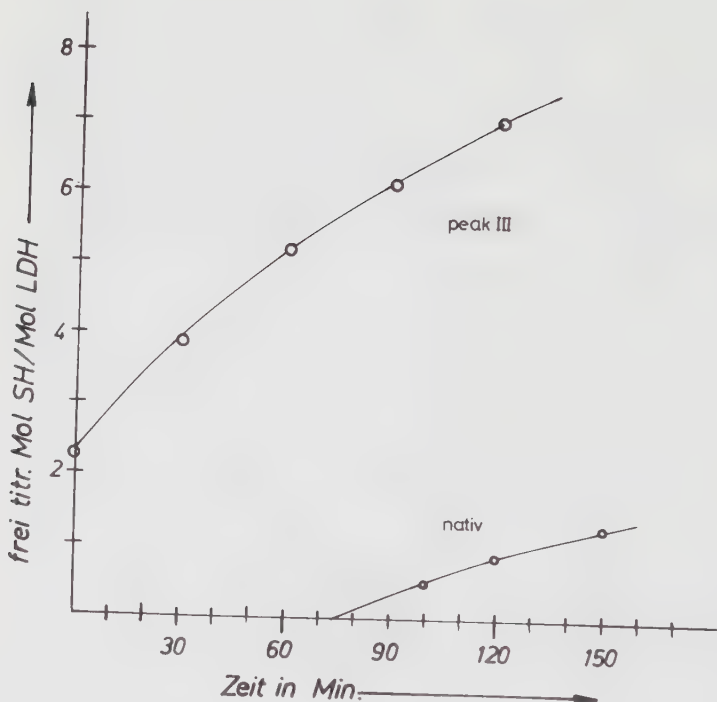


Abb. 15: Freie SH-Gruppen des peak III ($1,1 \times 10^{-6}M$) einer mit 400 krad bestrahlten und chromatographisch getrennten LDH-Lösung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit. Freie SH-Gruppen von nat. LDH gleicher Konz. 0,067 M PO_4 -Puffer, 1 mMol EDTA/l, 0,66 mM DTNB, pH 7,1.

Die freien SH-Gruppen der Bestrahlungsprodukte des peak I und II, wie wir sie bei Zusatz von EDTA im Bestrahlungspuffer bestimmten, sind in Abbildung 16 wiedergegeben. Wie schon ausgeführt wurde, fehlen unter diesen Bedingungen die stark vergrößerten Teilchen des peak III.

Wie auf Abbildung 16 zu sehen ist, reagieren am Anfang bei gleicher Konzentration ungefähr gleich viel SH-Gruppen in peak I und II. Der peak I zeigt einen ziemlich steilen Anstieg der freien SH-Gruppen. Nach einer Stunde haben bei einer mit der in Abbildung 15 vergleichbaren Konzentration ungefähr 8 SH-Gruppen reagiert (siehe durchgezogene Linie). Nach knapp einer Stunde war die Trübung so stark, daß die SH-Bestimmung abgebrochen werden mußte.

Der Anstieg der SH-Gruppen des peak II bei gleicher Konzentration erfolgt langsamer (siehe durchgezogene Linie) und die Trübung beginnt bei knapp 10 Stunden. Bis zum Ende der Messung haben ungefähr 11 Mol SH/Mol LDH reagiert.

Auf der Abbildung 16 sind weiterhin die freien SH-Gruppen von Versuchen mit niedriger LDH-Konzentration 7×10^{-7} Mol/l (gestrichelte Linie) angegeben. Es wird gezeigt, daß bei niedrigen LDH-Konzentrationen, wie in 3.6. ausgeführt wurde, die Reaktionen langsam verlaufen. Der Anstieg der SH-Gruppen erfolgt allmählich und die Zeit bis zum meßbaren Einsetzen der Trübung ist verlängert. Peak I fällt bei dieser Konzentration erst nach ungefähr 7 Stunden aus, während wir den Zeitpunkt der Trübung des peak II unter vergleichbaren Bedingungen nicht festlegen konnten. Die Messung wurde nach 50 Stunden ohne sichtbare Trübung abgebrochen. Es hatten 13 SH-Gruppen reagiert.

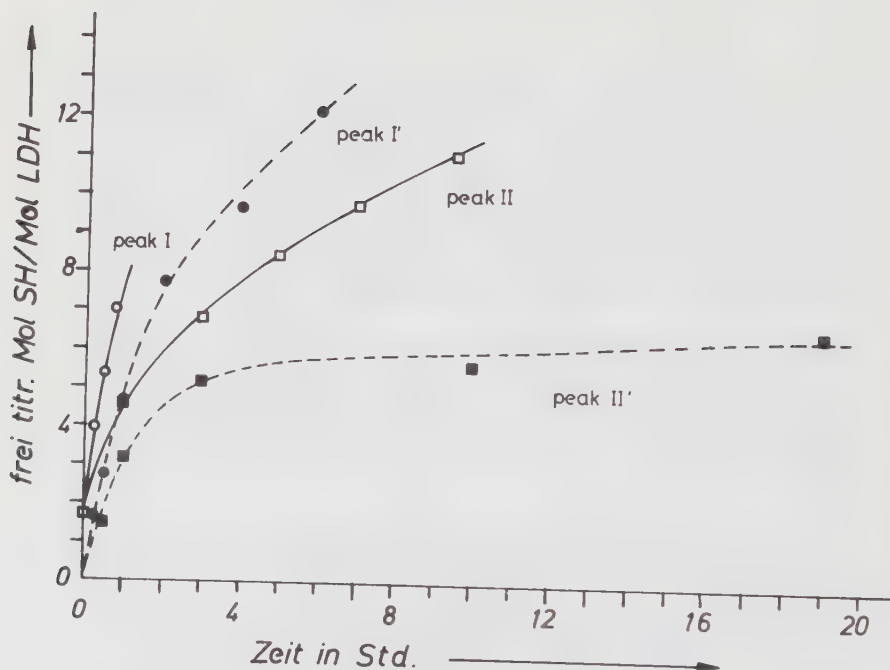


Abb. 16: Freie SH-Gruppen von chromatogr. getrennter LDH, die mit Zusatz von 1 mMol EDTA/l im Bestrahlungspuffer mit 400 krad bestrahlt wurde; bei höherer LDH-Konzentration: peak I ($1,8 \times 10^{-6}$ M) —○—○— und peak II ($2,3 \times 10^{-6}$ M) —□—□— und bei niedrigerer LDH-Konzentration: peak I ($7,2 \times 10^{-7}$ M) —●—●— und peak II (8×10^{-7} M) —■—■—. 0,067 M PO_4 Puffer, 1 mMol EDTA/l, 0,66 mM DTNB, pH 7,1.

Ein Vergleich zwischen den freien SH-Gruppen der ohne und der mit EDTA bestrahlten und chromatographisch getrennten LDH-Lösungen ergibt, daß die Anfangswerte bei vergleichbaren Konzentrationen im demselben Bereich bei 1 - 2 Mol SH/Mol LDH liegen. Die Unterschiede im Anstieg der freien SH-Gruppen sind ebenfalls nicht sehr groß. Im peak I der mit EDTA bestrahlten Lösung reagieren etwas mehr SH-Gruppen (1-2 Mol SH/Mol LDH) als im peak I der ohne EDTA bestrahlten Lösung. Im peak II der mit EDTA bestrahlten Lösung dagegen finden sich etwas weniger frei titrierbare SH-Gruppen (1/2 - 2 Mol SH/Mol LDH) als im peak III der ohne EDTA bestrahlten Lösung. Bemerkenswert ist jedoch, daß bei den ohne EDTA bestrahlten Lösungen die Trübung im peak I und III viel früher auftritt als im peak I und II bei den mit EDTA bestrahlten Lösungen.

3.11. Gesamter SH-Gehalt bei nativer und bestrahlter LDH

Wird LDH mit hochmolarem Harnstoff versetzt, so kommt es zu einer Auffaltung des Proteins. Die Gruppen, die beim nativen Molekül innen gelegen sind, werden durch die Auffaltung angreifenden Reagentien, wie z.B. DTNB, zugänglich. Unsere Bestimmungen der gesamten SH-Gruppen bei nativer und bestrahlter LDH führten wir nach den Angaben in 2.2.8.2. durch.

Um zu untersuchen, ob es bei Zusatz von Harnstoff zu einer Extinktionsänderung des TNB kommt, wurden die SH-Gruppen von bekannten Glutathion-Lösungen mit und ohne Harnstoff bestimmt. Es war kein Unterschied festzustellen. Geändert hat sich lediglich der Leerwert (DTNB + PO_4 -Puffer) in Gegenwart von Harnstoff; mit Harnstoff ist der Leerwert höher als ohne Harnstoff.

Bei Zusatz von Harnstoff tritt im Testansatz eine Schlierenbildung auf. Dies kann vermieden werden, wenn der Testansatz einige Male mit einem Micromix gerührt wird.

Die Konzentration der LDH betrug im Testansatz 2×10^{-6} , bzw. 7×10^{-7} Mol/l, bei einer DTNB-Konzentration von 0,66, bzw. 0,33 mMol/l.

Bei der nativen LDH lassen sich auf diese Weise $22 \pm 0,7$ SH-Gruppen bestimmen. Bei LDH, die mit einer Dosis von 400 krad bestrahlt wurde, waren nur noch 83,6 % der SH-Gruppen nachweisbar, das entspricht noch einer Anzahl von $18,5 \pm 0,41$ SH-Gruppen. Nach einer Dosis von 400 krad und einer Restaktivität von 13 % sind demnach ungefähr 4 SH-Gruppen zerstört.

Ob die Abnahme der SH-Gruppen ganz exponentiell verläuft, läßt sich in dem relativ kleinen untersuchten Dosisbereich nicht mit Sicherheit sagen. Höhere Dosen waren wegen technischer Schwierigkeiten (Überhitzen der Röhre) nicht möglich.

Um den gesamten SH-Gehalt der einzelnen peaks nach gel-chromatographischer Auftrennung der ohne EDTA bestrahlten LDH zu untersuchen, wurden die SH-Gruppen von peak I und III bei 2 Bestrahlungsversuchen mit je mehreren Messungen in Gegenwart von Harnstoff bestimmt.

Peak I hatte noch 79,2 % und peak III noch 65,8 % der SH-Gruppen des nativen Enzyms. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den Werten des noch unaufgetrennten Proteins überein, nach denen bei gleicher Dosis 83 % der gesamten SH-Gruppen vorhanden sind (siehe oben).

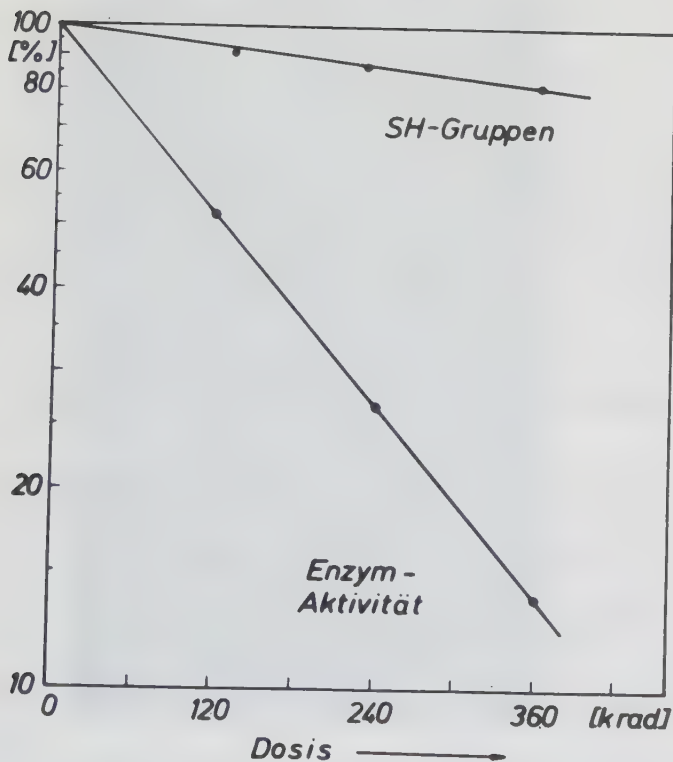


Abb. 17: Abnahme der gesamten SH-Gruppen und der spezif. Aktivität (in %) von LDH V mit zunehmender Dosis. Bestimmung der gesamten SH-Gruppen in 7 M Harnstoff. 2×10^{-6} M LDH, 0,66 mM DTNB, 0,067 M PO_4 -Puffer, 1 mMol EDTA/l, pH 7,1.

Diese Differenz läßt sich (siehe 3.7.) hauptsächlich durch die fehlerhafte Konzentrationsbestimmung der peaks nach der Auftrennung erklären und zum Teil auch mit einer Oxidation von SH-Gruppen (siehe 3.7.).

Versuche, bei denen oxidierte SH-Gruppen mit NaBH_4 nach der chromatographischen Auftrennung hätten reduziert werden können, scheiterten am starken Schäumen der verwandten Lösungen. Ein quantitatives Arbeiten war unmöglich; statt 22 Mol SH/Mol LDH ließen sich beim nativen Enzym nur insgesamt 19 Mol SH/Mol LDH finden. Es wurden deshalb keine weiteren Versuche mit NaBH_4 unternommen.

3.12. Untersuchungen mit der analytischen Ultrazentrifuge

Es wurden einige Versuche mit der analytischen Ultrazentrifuge durchgeführt^x, um zu sehen, ob bei der Bestrahlung von Proteinen eine Aggregation von Molekülen stattfindet.

Vom nativen Enzym wurde eine Konzentrationsreihe gemacht. Mit Hilfe der Schlierenoptik wurden die Sedimentationskoeffizienten bestimmt. Die Extrapolation auf S_0 ergab $S_0 = 7,4 \pm 0,1 \text{ S}$.

Mit der Ultrazentrifuge wurde dann bestrahltes, nicht chromatographisch getrenntes und getrenntes Protein des peak III untersucht.

^x Die Versuche wurden dankenswerterweise von Herrn Fey, Institut für Physiol. Chemie, Erlangen, ausgeführt und ausgewertet.

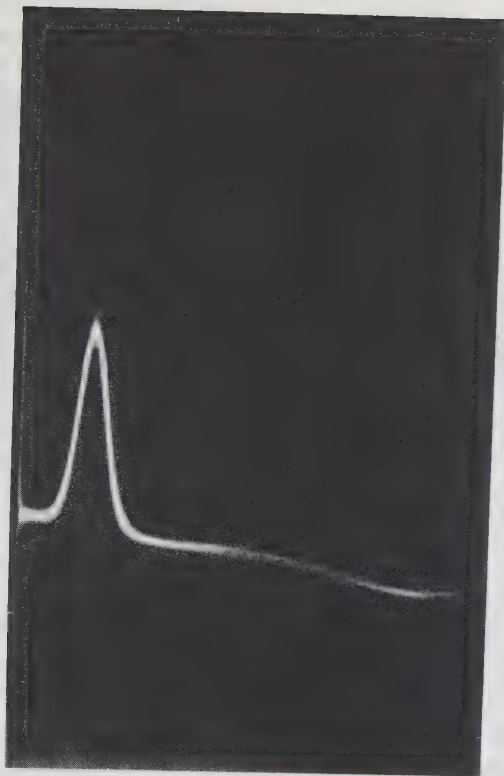


Abb. 18: Sedimentationsgeschwindigkeitslauf von nativer LDH. Peak von nativer LDH in der Schlierenoptik.

Für das bestrahlte Protein konnte keine Konzentrationsreihe hergestellt werden, da die Konzentration zu gering war. Es war nicht möglich die Konzentration von 3 mg/ml noch zu verringern, da selbst bei dieser Konzentration beim bestrahl-

ten Protein nur ein kleiner peak in der Schlierenoptik zu erkennen war. Um S_0 des bestrahlten Enzyms zu erhalten, mußte deshalb nach der Konzentrationsreihe für unbestrahlte LDH extrapoliert werden. Dieses Verfahren kann nur einen Schätzwert angeben, da unbekannt ist, in welcher Konzentration das Bestrahlungsprodukt, das Anlaß zu dem sedimentierenden peak gibt, tatsächlich vorliegt.

Auf jeden Fall ist diese Konzentration niedriger als die des nativen Enzyms, da die Fläche unter dem Gipfel (ein Maß für die Konzentration) klein ist und da beobachtet wurde, daß ein nicht vernachlässigbarer Anteil des bestrahlten Materials gleich zu Beginn unter Erhöhung der Nulllinie absedimentierte. Der Sedimentationskoeffizient des kleinen peaks beträgt $S = 7,6$ S. Würde die Konzentration der ursprünglichen Lösung vorliegen, so ergäbe sich nach der Auswertung der Schlierenoptik ein $S_0 = 8,9$ S und nach der UV-Optik ein $S_0 = 8,3$ S. Die Auswertung der Schlierenoptik ist glaubhafter, da die Extrapolation bei der nativen LDH auf 3 Punkten beruht. Eine Auswertung mit der UV-Optik war nur bei größter Konzentration möglich, so daß für die Extrapolation nur 2 Punkte vorhanden waren. Der S_0 -Wert des sedimentierten Materials muß auf jeden Fall höher liegen als der S_0 -Wert der nativen LDH, da der Sedimentationskoeffizient $S = 7,6$ S höher liegt als S_0 von nativer LDH.

Das mit $S = 7,6$ S sedimentierende Material ist in Abb. 19 gezeigt. Der peak weist auf das Vorhandensein von hochmolekularen Teilchen hin. Die oben erwähnte Erhöhung der Nulllinie spricht für vergrößerte Bestrahlungsprodukte von uneinheitlichem Molekulargewicht (siehe Abb. 19).

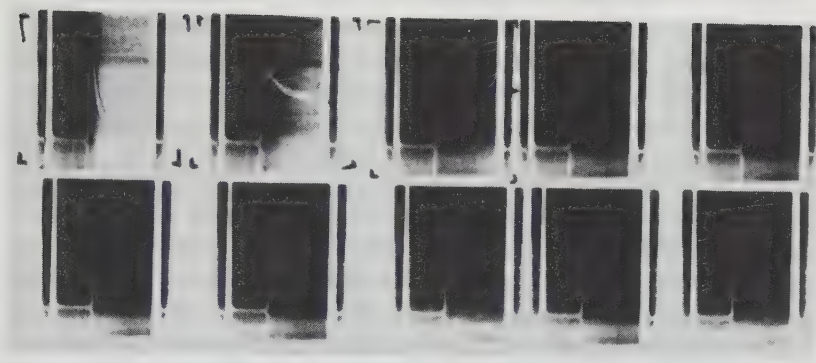


Abb. 19: Erhöhung der Grundlinie und Ablösen eines kleinen peaks in der Schlierenoptik bei bestrahlter LDH.

Ein gleichartiges Resultat wurde auch bei einem Lauf mit den gelchromatographisch getrennten Bestrahlungsprodukten des peak III gefunden. Dieser hochmolekulare Anteil des bestrahlten Materials sedimentierte nicht als einheitliche Bande sondern molekular-dispers, d.h. das Ausschlußvolumen besteht ebenfalls aus vergrößerten Molekülen mit unterschiedlichem Molekulargewicht.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Zahl der reaktiven SH-Gruppen von LDH V durch Bestrahlung erhöht wird. Daraus läßt sich schließen, daß die Tertiärstruktur des nativen Enzyms durch Radiolyse verändert worden ist. Es muß eine Entfaltung von Molekülen stattgefunden haben.

Weiterhin fand man nach Bestrahlung eine Abnahme der gesamten SH-Gruppen, d.h. Cystein muß abgebaut worden sein. Dies ist ein Hinweis, daß auch die Primärstruktur des Enzyms angegriffen worden ist.

Mit Hilfe der Ultrazentrifuge konnte nachgewiesen werden, daß die Bestrahlungsprodukte zum Teil aus Aggregaten von uneinheitlichem Molekulargewicht bestehen. Damit wurde gezeigt, daß die Vergrößerung von bestrahlten Molekülen, die sich z.B. bei der gelchromatographischen Auftrennung findet, nicht nur durch Entfaltung sondern auch durch Aggregation bedingt ist.

Die Untersuchungsergebnisse sollen im Folgenden diskutiert und mit den Arbeiten anderer Autoren verglichen werden.

Die SH-Bestimmungen wurden nach der Methode von ELLMAN (2,3) mit DTNB durchgeführt. Es lagen bisher keine ausführlichen Arbeiten über SH-Bestimmungen mit DTNB bei LDH vor. Die Bedingungen für diese Reaktion mußten zuerst untersucht werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Der Disulfidaustausch mit DTNB soll zwischen pH 6-9 (6,13) vollständig stattfinden. Wir führten unsere Versuche bei pH 7,1 durch, da wegen der Messungen der enzymatischen Aktivität das pH-Optimum von LDH (?) berücksichtigt wer-

den mußte. Das DTNB in der Stammlösung lag in einer Konzentration von 19,5 mMol/l in 0,1 M PO_4 -Puffer vor. Die SH-Bestimmungen wurden in der Regel bei einer DTNB-Konzentration von 0,66 mMol/l und einer LDH-Konzentration von $1 - 5 \times 10^{-6}$ Mol/l durchgeführt (siehe 3.5. und 3.6.). Die SH-Bestimmungen wurden im gleichen Puffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{PO}_4$) durchgeführt, der sich für die Bestrahlung als günstig erwiesen hatte; es hatte sich bei den Eichkurven mit Glutathion gezeigt, daß die TNB-Ausbeute von der Ionenstärke des verwandten Puffers unabhängig ist (siehe 3.2.).

Die ELLMAN'sche Methode beruht auf einer kolorimetrischen Messung der SH-Gruppen. Als Extinktionskoeffizient wurde der von ELLMAN angegebene Wert $\epsilon = 13\ 600$ benutzt. Dieser Wert wurde von den meisten Autoren, die mit DTNB gearbeitet haben, übernommen (13,26-29). In einer neueren Arbeit von HUMPHREY, WARD und HINZE (6) wird $\epsilon = 15\ 500$ angegeben. Sollte dieser Wert richtig sein - der im Gegensatz zu dem von ELLMAN angegebenen auch die in DTNB neu eingeführten COOH-Gruppen berücksichtigt - , so müssen die in dieser Arbeit berechneten Werte für SH-Gruppen durch 1,14 dividiert werden. Diese Korrektur ist jedoch für das Ergebnis unerheblich.

Bei nativer LDH V-Lösung fanden wir mit der ELLMAN'schen Reaktion keine freien SH-Gruppen, die sofort reagierten. LDH V fiel aus, wenn der Lösung DTNB zugesetzt wurde. Der Zeitpunkt der Ausfällung war abhängig von der Konzentration der Reaktionspartner (siehe 3.5. und 3.6.). Bis zur Ausfällung des Proteins (Trübungsmessung siehe 3.5.) konnten 1 - 2 SH-Gruppen bestimmt werden. Die Reaktion dieser SH-Gruppen muß durch eine denaturierende Wirkung von DTNB auf LDH erklärt werden.

In Arbeiten über LDH I von Schweineherz (5,9,10) wurde ebenfalls gezeigt, daß SH-Reagentien wie z.B. DTNB oder PCMB das Enzym denaturieren. JECKEL und PFLEIDERER (5) wiesen durch optische Rotationsdispersion nach, daß nach der Reaktion von mehr als 1,5 Mol SH/Mol Untereinheit mit PCMB eine irreversible Entfaltung von LDH I stattfindet. Die 1,5 Mol SH/Mol Untereinheit entsprechen den essentiellen SH-Gruppen von LDH I. Die Autoren schlossen aus ihren Untersuchungen, daß die 'nicht essentiellen' SH-Gruppen zur Aufrechterhaltung der Struktur notwendig sind.

Bei LDH V konnten bisher keine sofort reaktionsfähigen essentiellen SH-Gruppen nachgewiesen werden (4). Es wird jedoch angenommen, daß auch LDH V essentielle SH-Gruppen besitzt (4). Diese SH-Gruppen sollen in 'Taschen' liegen, in die ein SH-Reagenz mit einem Phenolrest nicht eindringen kann. Es besteht die Möglichkeit, daß DTNB in diesem Fall sofort mit SH-Gruppen reagiert, die zur Aufrechterhaltung der Struktur notwendig sind, und dadurch das rasche Ausfällen des Proteins bedingt.

Das ELLMAN Reagenz hatte sich bei anderen SH-Enzymen als sehr geeignet für die SH-Bestimmungen erwiesen. So konnten KLEPPE und DAMJANOVICH (13) alle 16 SH-Gruppen des Enzyms Phosphorylase b nachweisen. Es wurde die Reaktionsfähigkeit der SH-Gruppen des Enzyms auf Grund der unterschiedlichen Reaktionsdauer der einzelnen SH-Gruppen mit DTNB bestimmt. Alle SH-Gruppen wurden durch das Einwirken des DTNB in einer bestimmten Reihenfolge freigesetzt und dem DTNB zugänglich. Im Gegensatz zu LDH fiel Phosphorylase b bei diesen Reaktionen nicht aus.

Es hatte sich also gezeigt, daß bei nativer LDH V keine SH-Gruppen mit DTNB sofort reagierten, und daß auch eine langsame Titration der SH-Gruppen durch das Einwirken von

DTNB wegen des Ausfällens des Proteins nur sehr begrenzt möglich war. Da aber davon ausgegangen wurde, daß die beim nativen Molekül nicht reaktionsfähigen SH-Gruppen durch strahleninduzierte Entfaltung den SH-Reagentien zugänglich werden, ist diese SH-Bestimmung für die gegebene Aufgabenstellung sehr geeignet.

Auf Konformationsänderungen von Proteinen durch Radiolyse wurde in mehreren Arbeiten bereits hingewiesen. Durch gel-chromatographische Trennung von bestrahlten Proteinlösungen (SCHÜSSLER und JUNG (17), DENKL (14)) gelang es, verschieden große Bestrahlungsprodukte zu isolieren. Mit der analytischen Ultrazentrifuge (SCHÜSSLER und JUNG (17), ADELSTEIN (20,21), WINSTEAD und REECE (15)) wurden in bestrahlten Lösungen Aggregate und Molekülbruchstücke nachgewiesen. Es war nicht ganz geklärt, ob die Molekülvergrößerung durch die Aggregation allein oder bei anderen Proteinen vielleicht allein durch eine Entfaltung oder aber durch beide Mechanismen gleichzeitig zustande kommt.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist eindeutig gezeigt, daß bei Bestrahlung von wässriger LDH V-Lösung eine Entfaltung der Moleküle stattfindet, da mit steigender Dosis und mit abnehmender enzymatischer Aktivität die SH-Gruppen immer reaktionsfähiger werden. Unter anderen Bestrahlungsbedingungen konnten DOSE und RAJEWSKY (21) und WINSTEAD und REECE (15) bei LDH I durch Reaktion mit PCMB ebenfalls eine Zunahme der SH-Gruppen feststellen.

Welche Bedeutung die Entfaltung für die enzymatische Inaktivierung haben kann, geht aus einer Arbeit von JECKEL und PFLEIDERER (5) hervor. Die Autoren wiesen nach, daß die Coenzymbindung bei LDH I nur am intakten und nicht am entfalteten Molekül möglich ist.

Die Bestimmung der SH-Gruppen der durch Gelfiltration getrennten Bestrahlungsprodukte sollte den Entfaltungsgrad der einzelnen Komponenten zeigen. Es ergaben sich keine so großen Unterschiede wie man zunächst nach den verschiedenen Restaktivitäten und der verschiedenen Molekülgröße der Bestrahlungsprodukte erwartet hätte. Es sei hier noch angeführt, daß die gelchromatographische Trennung der bestrahlten LDH in dieser Arbeit durch eine neu angefertigte Säule wesentlich verbessert wurde (siehe KUNIGK (32)).

Die Moleküle des peak I verhielten sich bei der Gelchromatographie genauso wie native LDH. Da die Molekülgröße dieser Komponente unverändert im Vergleich zu nativer LDH erschien, wurde die Inaktivierung bisher auf eine Schädigung der Primärstruktur zurückgeführt (SCHÜSSLER und JUNG (18), DENKL (14)). SCHÜSSLER und JUNG konnten bei Ribonuclease eine veränderte Aminosäurezusammensetzung des peak I im Vergleich zum nativen Enzym nachweisen. Die Bestimmung der freien SH-Gruppen beweist jedoch zudem eine Strukturänderung der Moleküle des peak I. Es fanden sich mehr SH-Gruppen als bei nativer LDH. Die Moleküle des peak I müssen also schon entfaltet sein, obwohl sich diese Molekülvergrößerung noch nicht bei der Gelfiltration bemerkbar macht. Nach diesen Ergebnissen ist der Aktivitätsverlust des peak I nicht nur durch eine Schädigung der Primärstruktur sondern auch durch eine Schädigung der Tertiärstruktur bedingt.

Der peak III hat fast gleich viel sofort reaktionsfähige SH-Gruppen wie peak I, obwohl im peak III die sehr stark vergrößerten Bestrahlungsprodukte vorliegen. Auffallend ist jedoch, daß diese vergrößerten Bestrahlungsprodukte viel später bei der ELLMAN'schen Reaktion ausfallen als die Bestrahlungsprodukte des peak I. Bis zur Ausfällung reagieren mehr freie SH-Gruppen mit DTNB als im peak I. Es ist anzunehmen, daß die Moleküle des peak III so stark

geschädigt sind, daß die SH-Gruppen nicht mehr zur Aufrechterhaltung der Struktur (siehe oben) notwendig sind. Die SH-Gruppen, die beim nativen und beim nur leicht entfalteten Molekül des peak I dem DTNB nicht zugänglich sind, können hier nach Einwirken des DTNB ohne Ausfällung reagieren.

Wenn auch eine stärkere Veränderung und eine stärkere Entfaltung der Moleküle im peak III als im peak I vorliegt - angezeigt durch die verlängerte Reaktionsdauer mit DTNB - , so ist das Molekül doch nicht so weit entfaltet - angezeigt durch die wenigen sofort reaktionsfähigen SH-Gruppen - , als daß die starke Vergrößerung der Moleküle allein durch eine Entfaltung befriedigend erklärt werden könnte. Schon dies ist ein Hinweis, daß die geschädigten Moleküle auch aggregieren (siehe unten). Diese Annahme konnte durch neuere Versuchsergebnisse (31) bestätigt werden: Es wurde LDH V mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat völlig entfaltet und gel-chromatographisch untersucht. Selbst LDH, bei der alle SH-Gruppen reaktionsfähig waren, wurde noch durch das Gel verzögert, während der oben diskutierte peak III im Ausschlußbereich von 0-200 liegt. Das bedeutet, daß LDH, die nur einige sofort reaktionsfähigen SH-Gruppen aufweist, die gemessene Größe nur durch Aggregation erreichen kann.

Eine Aggregation von bestrahlten Molekülen konnte auch mit der analytischen Ultrazentrifuge nachgewiesen werden. Es entstanden durch die Bestrahlung der LDH Aggregate von uneinheitlichem Molekulargewicht. WINSTEAD und REECE (15) wiesen bei LDH I ebenfalls eine Aggregation von strahlengeschädigten Molekülen nach. ADELSTEIN und MEE (20) dagegen fanden bei Glutamat-Dehydrogenase mit der Ultrazentrifuge eine Dissoziation von Molekülen (- Oder hat es sich hier um entfaltete Moleküle gehandelt? Diese Frage läßt sich bei Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge nicht sicher beantworten). Erst bei hohen Dosen fanden die Autoren eine geringfügige Aggregation.

Auf eine Dissoziation bestrahlter Moleküle wurde auch in anderen Arbeiten hingewiesen. GARRISON (19,20) zeigte besonders die Bedeutung von Peptidbrüchen. DENKL (14) bestrahlte LDH V bei hoher Ionenstärke (Zusatz von 1 M NaCl im Bestrahlungspuffer) und isolierte unter diesen Bedingungen nach chromatographischer Trennung der bestrahlten LDH nicht nur größere sondern auch kleinere Bestrahlungsprodukte als native LDH.

Bei niedrigen Ionenstärken, wie sie in unseren Versuchen vorlag, ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß dissoziierte Peptidketten mit anderen geschädigten Molekülen reagieren. Es wurden bei unseren Versuchen keine Molekülbruchstücke gefunden. Die Aggregation von geschädigten, entfalteten Molekülen untereinander und mit Peptidketten könnte zu den stark vergrößerten Bestrahlungsprodukten mit unterschiedlichem Molekulargewicht führen.

LDH-Lösungen wurden auch in Anwesenheit von EDTA, einem organischen Chelatbildner, bestrahlt. Nach vergleichbaren applizierten Dosen hatte die mit EDTA bestrahlte LDH eine höhere Restaktivität und nach der Gelfiltration ein anderes Chromatogramm als LDH-Lösungen, die ohne Zusatz von EDTA bestrahlt wurden. Besonders erwähnenswert scheint, daß bei der gelchromatographischen Trennung der bestrahlten LDH-Lösung der peak III mit den stark vergrößerten Bestrahlungsprodukten fehlte. Es fand sich jedoch ein peak II mit leicht vergrößerten Bestrahlungsprodukten, der bei der Bestrahlung ohne EDTA kaum abzugrenzen war.

Die geringe Inaktivierung der in Anwesenheit von EDTA bestrahlten LDH läßt sich durch ein Abfangen von Wasserradikalen durch EDTA erklären. Eine Aggregation zu vergrößerten Bestrahlungsprodukten könnte dadurch verhindert sein, daß Proteinradikale nicht miteinander sondern mit EDTA-Radikalen reagieren.

Die Bestimmung der freien SH-Gruppen ergab, daß bestrahlte und chromatographisch nicht getrennte LDH-Lösung, der EDTA im Bestrahlungspuffer zugesetzt war, den gleichen Anstieg an freien SH-Gruppen zeigte wie unter vergleichbaren Bedingungen bestrahlte LDH-Lösung, der kein EDTA im Bestrahlungspuffer zugesetzt war. Dieses Verhalten war zunächst überraschend, da in beiden Lösungen sich nach der gleichen eingestrahlten Dosis ganz unterschiedliche Restaktivitäten und Chromatogramme ergeben hatten. Es wird durch einen Vergleich der freien SH-Gruppen in den einzelnen gelchromatographisch isolierten Komponenten verständlich.

Bei Zusatz von EDTA im Bestrahlungspuffer hatten die Bestrahlungsprodukte des peak I wenig sofort reaktionsfähige SH-Gruppen. Der Anstieg der freien SH-Gruppen mit der Zeit war jedoch größer und das Protein fiel bei der ELLMAN'schen Reaktion später aus als bei peak I der LDH-Lösung, die ohne Zusatz von EDTA im Bestrahlungspuffer bestrahlt worden war (peak I mit EDTA im Bestrahlungspuffer: Ausfällung nach 45 Minuten, Reaktion von 7 SH-Gruppen; peak I ohne EDTA im Bestrahlungspuffer: Ausfällung nach 15 Minuten, Reaktion von 2 SH-Gruppen). Die LDH-Moleküle des peak I sind also bei der Bestrahlung in Anwesenheit von EDTA etwas mehr geschädigt als bei der Bestrahlung ohne Zusatz von EDTA. Erstaunlich dabei ist, daß die Restaktivität trotz der etwas stärkeren Schädigung des Moleküls höher liegt als bei vergleichbaren Versuchen mit LDH, die ohne Zusatz von EDTA bestrahlt wurde.

Der peak II mit den vergrößerten Bestrahlungsprodukten hatte ebenfalls wenig sofort reaktionsfähige SH-Gruppen. Die Trübung bei der SH-Bestimmung setzte viel später ein und bis zur Ausfällung reagierten mehr freie SH-Gruppen als im peak III der LDH-Lösung, die ohne Zusatz von EDTA bestrahlt worden war (peak II mit EDTA im Bestrahlungspuffer: Ausfällung

nach 9 1/2 Stunden, Reaktion von 11 SH-Gruppen; peak III ohne EDTA im Bestrahlungspuffer: Ausfällung nach 2 1/2 Stunden, Reaktion von knapp 8 SH-Gruppen). Diese Versuchsergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Bestrahlungsprodukte des peak II stark geschädigt und entfaltet sind.

Es ist wahrscheinlich, daß die Vergrößerung der Moleküle des peak II nur durch Entfaltung und nicht durch Aggregation zustande kommt. Dafür spricht einerseits die stark Entfaltung bei einer im Vergleich zu peak III geringen Molekülvergrößerung und andererseits das völlige Fehlen von peak III mit seinen stark vergrößerten Teilchen, d.h. keinerlei Bildung von großen Molekülaggregaten. SCHÜSSLER und JUNG (17) nehmen an, daß der peak II von bestrahlter und chromatographisch getrennter Ribonuclease auch nur entfaltete Moleküle enthält.

Im Chromatogramm der mit Zusatz von EDTA bestrahlten Lösungen bildet die Hauptkomponente der peak I, während bei den ohne Zusatz von EDTA bestrahlten Lösungen die Hauptkomponente der peak III ist. Diese beiden Komponenten haben einen ähnlichen Anstieg der reaktiven SH-Gruppen (siehe oben), und es müssen deshalb auch die SH-Bestimmungen bei den nicht chromatographisch getrennten Proben übereinstimmende Werte ergeben.

Die folgenden Untersuchungen dienten der Bestimmung des gesamten Cysteingehalts von nativer und bestrahlter LDH V. Um alles Cystein, d.h. alle SH-Gruppen des Enzyms erfassen zu können, wurden die LDH-Moleküle in 7 M Harnstoff vollständig entfaltet. Durch die Auffaltung wurden alle vorher verdeckten SH-Gruppen dem ELLMAN Reagenz zugänglich. Der Extinktionskoeffizient blieb in der Harnstofflösung nach unseren Versuchen unverändert; diese Angabe findet sich auch bei anderen Autoren (26). Bei nativer LDH V reagierten 22,1 SH-

Gruppen. Dieser Wert wurde wie alle unsere SH-Bestimmungen mit dem Extinktionskoeffizienten von ELLMAN = 13 600 und einem Molekulargewicht für LDH V von 142 000 (1) berechnet. Wenn die SH-Gruppen mit dem oben angeführten Extinktionskoeffizienten von HUMPHREY (6) = 15 500 berechnet werden, so würde das 19,4 SH-Gruppen entsprechen. Selbst dieser Wert liegt noch etwas höher als in der Literatur angegeben wird. DI SABATO, PESCE und KAPLAN (11) bestimmten mit PCMB in Harnstofflösung 16,7 SH-Gruppen, ausgehend von einem Molekulargewicht von 135 000. Rechnet man diesen Wert für ein Molekulargewicht von 142 000 um, so ergibt das 17,5 Mol SH-Gruppen. PFLEIDERER, JECKEL und WIELAND (12) fanden mit Hilfe der Aminosäurenanalyse 14 Mol SH-Gruppen / 126 000 g Protein, das entspricht 15,8 Mol SH-Gruppen / 142 000 g Protein.

Bei bestrahlter LDH V reagierten weniger SH-Gruppen mit DTNB als bei nativer. Nach einer applizierten Dosis von 400 krad, das entspricht einer Restaktivität des Enzyms von 13 %, hatte der gesamte SH-Gehalt um fast 20 % abgenommen. Ungefähr 4 SH-Gruppen waren also durch die Bestrahlung abgebaut worden.

WINSTEAD und REECE (15) fanden nach Bestrahlung von LDH I von Schweineherz ebenfalls eine Abnahme der SH-Gruppen. Mit Hilfe der Aminosäurenanalyse wiesen sie nach, daß nach einer Dosis von 200 krad der Cysteingehalt um 5 Cystein verringert war; das Cystein ist nicht oxidiert gewesen.

Welche Beziehung besteht zwischen der Abnahme von SH-Gruppen und der Inaktivierung des Enzyms durch ionisierende Strahlung? SH-Gruppen besitzen häufig als sogenannte essentielle SH-Gruppen am aktiven Zentrum des Moleküls entscheidende Bedeutung für die enzymatische Aktivität. Da sich bei SH-Enzymen ein Abbau von SH-Gruppen nach Bestrahlung nach-

weisen läßt, wird die Strahleninaktivierung häufig auf die Zerstörung der essentiellen SH-Gruppen zurückgeführt. ADELSTEIN (19) kam nach Untersuchungen an Glutamat- und Lactat-Dehydrogenase zu dem Schluß, daß die Zerstörung von SH-Gruppen sehr wahrscheinlich die Inaktivierung bedinge. SANNER und PIHL (24,25) betonen besonders die Bedeutung von SH-Gruppen, die SH-Reagentien gegenüber sehr reaktionsfähig sind, und machen diese SH-Gruppen für die Strahlenempfindlichkeit der Enzyme verantwortlich.

Es erscheint hier wichtig anzuführen, daß durch die Bestrahlung nicht nur SH-Gruppen, sondern auch andere Aminosäuren angegriffen werden. DENKL (14) wies z.B. bei LDH V einen Abbau von Tyrosin nach (Tyrosin soll bei LDH I von Schweineherz am aktiven Zentrum genauso beteiligt sein wie Cystein (9,30). SCHÜSSLER und JUNG (18) zeigten vielfältige Veränderungen der Primärstruktur bei bestrahlter Ribonuclease und WINSTEAD (25) bei bestrahlter LDH I. Die SH-Gruppen verlieren damit an Bedeutung. Es läßt sich auch keineswegs sicher sagen, ob die knapp 4 durch die Bestrahlung abgebauten SH-Gruppen gerade die 4 essentiellen SH-Gruppen des Enzyms sind. Es ist sogar recht zweifelhaft, da die Oberfläche des Enzyms durch die Bestrahlung stark verändert wird (siehe oben) und somit auch nicht essentielle SH-Gruppen mit Wasserradikalen reagieren könnten.

Welche Veränderungen für die Inaktivierung der LDH V hervorragende Bedeutung besitzen, kann mit unserer Untersuchungsmethode nicht genau festgestellt werden. Fest steht jedoch, daß die Inaktivierung von LDH V nicht allein auf die Zerstörung von einigen SH-Gruppen zurückgeführt werden kann. Wie in dieser Arbeit aufgezeigt wurde, ist als ein wesentlicher Faktor der Inaktivierung die Konformationsänderung des Moleküls zu berücksichtigen.

WINSTEAD (16) konnte in einer Untersuchung zeigen, daß die Strahlenempfindlichkeit eines Enzyms nicht von seinen SH-Gruppen abhängig ist. Er fand eine sehr ähnliche strahlenbedingte Inaktivierung bei zwei SH-Enzymen, von denen eines eine essentielle und das andere keine essentielle SH-Gruppe besaß, und bei einem weiteren Enzym ganz ohne SH-Gruppen.

Es sollte auch der gesamte SH-Gehalt der einzelnen peaks bestimmt werden, um den Abbau in den einzelnen Komponenten vergleichen zu können. Wegen der Schwierigkeiten, die bei diesen Versuchen auftraten (Konzentrationsbestimmung der bestrahlten Lösung und Oxidation), konnten hier jedoch keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden.

Mit Hilfe dieser Untersuchung hätte man vielleicht aufzeigen können, ob ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der einzelnen Komponenten und ihrem Cystein-Gehalt besteht. Es wäre zum Beispiel denkbar, daß eine Aggregation der Moleküle des peak III u.a. über Disulfidbrücken stattfindet. Nach anderen Arbeiten zu urteilen ist das allerdings unwahrscheinlich, DENKL (14) wies mit Hilfe der Aminosäurenanalyse nach, daß bei bestrahlter LDH V kein Cystin vorhanden ist. WINSTEAD und REECE (15) fanden bei bestrahlter LDH I ebenfalls keine oxidierten SH-Gruppen, d.h. kein Cystin.

Es finden sich in anderen Arbeiten auch keine Hinweise, daß ein direkter Zusammenhang zwischen Inaktivierungsgrad und Schädigung einzelner Aminosäuren in den verschiedenen isolierten Komponenten besteht. SCHÜSSLER und JUNG (18) zeigten bei den Bestrahlungsprodukten von Ribonuclease, die sie durch Gelfiltration erhielten, daß der Abbau strahlenempfindlicher Aminosäuren in allen Komponenten mit zunehmender Dosis gleich schnell und unabhängig von der Aktivität und Molekülgröße der Bestrahlungsprodukte erfolgt.

Die hier beschriebenen und diskutierten Versuche ergaben weiteren Aufschluß über die strahleninduzierten Konformationsänderungen, die gleichzeitig mit der Inaktivierung der Enzyme stattfinden. Es geht nicht daraus hervor, daß der Radiolyse der SH-Gruppen die entscheidende Rolle für die Inaktivierung zukommt.

5. Zusammenfassung

LDH V wurde mit Röntgenstrahlen in wässriger Lösung unter N_2 bestrahlt. Mit Hilfe der SH-Bestimmung wurde eine Auffaltung des bestrahlten Enzyms mit zunehmender Dosis und abnehmender enzymatischer Aktivität nachgewiesen. Das bestrahlte Enzym wurde chromatographisch getrennt. Die SH-Bestimmung ergab, daß die Bestrahlungsprodukte des peak I, die nach dem Chromatogramm die gleiche Größe wie native LDH besitzen, schon etwas entfaltet sind. Die verminderte enzymatische Aktivität des peak I kann deshalb nicht mehr allein durch eine Änderung der Primärstruktur erklärt werden. Die Bestrahlungsprodukte des peak III sind etwas stärker entfaltet als die des peak I, es liegt jedoch keine vollständige Auffaltung des Moleküls vor. Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge konnte gezeigt werden, daß die Molekülvergrößerung der bestrahlten LDH V durch Aggregation zustande kommt. Die Aggregate haben kein einheitliches Molekulargewicht. LDH V, die mit Zusatz einer organischen Substanz (EDTA) im Bestrahlungspuffer bestrahlt wurde, zeigte bei gleicher eingestrahlter Dosis eine geringere Inaktivierung als LDH V, die ohne Zusatz von EDTA bestrahlt wurde. Dem Chromatogramm dieser bestrahlten LDH-Lösung fehlten die stark vergrößerten Teilchen des peak III. Es lag jedoch ein verhältnismäßig großer peak II vor. Die SH-Bestimmung läßt den Schluß zu, daß die Moleküle dieses peaks nur entfaltet und nicht aggregiert sind.

Die Bestimmung der gesamten SH-Gruppen von nativer und bestrahlter LDH nach Auffaltung des Enzyms in 7 M Harnstoff ergab eine Abnahme des Cysteins mit steigender Dosis.

Die Untersuchungen zeigten die komplexen molekularen Veränderungen sowohl der Primär- als auch der Tertiärstruktur bei bestrahlter LDH. Es ist nach den vorliegenden Ergebnissen unwahrscheinlich, daß einem einzelnen Faktor, z.B. der Zerstörung von Cystein, bei der strahleninduzierten Inaktivierung eine hervorragende Bedeutung zukommt.

6. Literatur

1. JAENICKE, R. und S. KNOF:
European J. Biochem. 4, 157 - 163 (1968)
2. ELLMAN, G.L. :
Arch. Biochem. Biophys. 74, 443 - 450 (1958)
3. ELLMAN, G.L. :
Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77 (1959)
4. HOLBROOK, J.J., G. PFLEIDERER, J. SCHNETGER u. S. DIEMAIR:
Biochem. Z. 344, 1 - 44 (1966)
5. JECKEL, D. und G. PFLEIDERER:
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 903 - 914 (1969)
6. HUMPHREY, R.E., H.W. MELBOURNE und W. HINZE:
Analytic. Chem., 42, 698 - 702 (1970)
7. PFLEIDERER, G.:
Hoppe-Seyler/Tierfelder: Handbuch, 6.Bd., Teil A, S. 356
(1964)
8. WACHSMUTH, E.D. und G. PFLEIDERER:
Biochem. Z. 336, 107 - 117 (1962)
9. PFLEIDERER, G. und D. JECKEL:
European J. Biochem. 2, 171 - 175 (1967)
10. DI SABATO, G. und N. O. KAPLAN:
Biochem. 2, 776 (1963)
11. DI SABATO, G., A. PESCE und N.O. KAPLAN:
Biochem. Biophys. Acta 77, 135 - 138 (1963)

12. PFLEIDERER, G., D. JECKEL und Th. WIELAND:
Arch. Biochem. Biophys. 83, 275 (1959)
13. KLEPPE, K. und S. DAMJANOVICH:
Biochem. Biophys. Acta 185, 88 - 102 (1969)
14. DENKL, C.P.:
Zur Strahleninaktivierung der LDH in wässriger Lösung,
Dissertation Erlangen (1971)
15. WINSTEAD, J.A. und T.C. REECE:
Rad. Res. 41, 125 - 134 (1970)
16. WINSTEAD, J.A.:
Rad. Res. 30, 832 - 840 (1967)
17. JUNG, H. und H. SCHÜSSLER:
Z. Naturforsch. 21b (1966)
18. SCHÜSSLER, H. und H. JUNG:
Z. Naturforsch. 22b (1967)
19. ADELSTEIN, S. J.:
Biochem. 4, 891 - 896 (1965)
20. ADELSTEIN, S.J. und L.K. MEE:
Biochem. J. 80, 406 - 414 (1961)
21. DOSE, K. und B. RAJEWSKY in Strahlenforschung und
Strahlenbehandlung S. 215 (1965)
22. GARRISON, W.M. und B.W. WEEKS:
Rad. Res. 17, 341 - 352 (1962)
23. RODGERS, M.A.J., A. HARREY und W.M. GARRISON:
J. American Chem. Soc. 90, 795 (1968)

24. PIHL, A. und T. SANNER:
Rad. Res. 19, 27 - 41 (1963)
25. SANNER, T. und A. PIHL:
Scand. J. clin. Lab. Invest. 22, 53 - 63 (1968)
26. HABEEB, A.F.S.:
Biochem. Biophys. Acta 115, 440 - 445 (1966)
27. COLMAN, R.F.:
Biochem. 8, 888 - 898 (1969)
28. GRAZI, E., V. VIGI und N. ROSSI:
European J. Biochem. 1, 182 - 186 (1967)
29. KUO, T. und M. DE LUCA:
Biochem. 8, 4762 - 4768 (1969)
30. PFLEIDERER, G., Ch. WOENCKHANS, D. JECKEL und K. MELLA:
in Pyridine Nucleotide - Dependent Dehydrogenases
S. 145 (1970)
31. EICHHORN, M:
Über die Denaturierung von Lactatdehydrogenase durch
Dodecylsulfat, Dissertation Erlangen (1973)
32. KUNIGK, K.:
Untersuchungen an Lactatdehydrogenase nach Röntgenbe-
strahlung in Lösung, Dissertation Erlangen (1973)

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Pauly möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die großzügige materielle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit recht herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. H. Schüssler, unter deren Führung und Anleitung diese Arbeit entstanden ist. Frau Dr. Schüssler hat durch ihre sachverständigen Anregungen und durch ihren stets hilfsbereiten Rat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich Herrn Dipl.-Physiker Dr. Th. Schmidt für die Durchführung der Dosismessung. Herrn Dipl.-Phys. Fey vom Institut für Physiologische Chemie danke ich für die Molekulargewichtsbestimmungen mit der analytischen Ultrazentrifuge.

Es sollte auch die gute Zusammenarbeit mit Herrn Kunigk erwähnt werden, der Lactatdehydrogenase nach Bestrahlung in wässriger Lösung für seine Dissertation (32) untersuchte.

Lebenslauf

Am 24.6.1947 wurde ich als Tochter des Artur Maser und seiner Ehefrau Lydia, geb. Hirsch, in Ludwigsburg-Hoheneck, Baden-Württemberg, geboren.

Eingeschult wurde ich im Jahr 1954. Nach vier Jahren kam ich auf das Goethe-Gymnasium in Ludwigsburg, wo ich im Herbst 1966 das Abitur ablegte. Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Erlangen - Nürnberg. Dort legte ich im Februar 1969 die ärztliche Vorprüfung ab. Meinen Mann Reinhold Müller heiratete ich 1967. Das medizinische Studium beendete ich im Wintersemester 1972/73 mit der ärztlichen Prüfung.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990